

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÉSSICA CAROLINE BIGASKI RIBEIRO

PROPRIEDADES DO ÁCIDO LACTOBIONICO EM MODELOS LÁCTEOS

CURITIBA

2016

JÉSSICA CAROLINE BIGASKI RIBEIRO

## PROPRIEDADES DO ÁCIDO LACTOBIONICO EM MODELOS LÁCTEOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Lucia Masson  
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Granato

CURITIBA

2016

Ribeiro, Jéssica Caroline Bigaski  
Propriedades do ácido lactobionico em modelos lácteos / Jéssica  
Caroline Bigaski Ribeiro. – Curitiba, 2016.  
110 f. : il.; tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor  
de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos.

Orientadora: Maria Lucia Masson  
Coorientador: Daniel Granato  
Bibliografia: p.86-104


1. Lactose. 2. Microestrutura. 3. Liberação de aromas.  
I. Masson, Maria Lucia. II. Granato, Daniel. III. Título.


CDD 637.1476


**JÉSSICA CAROLINE BIGASKI RIBEIRO**

**PROPRIEDADES DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO EM MODELOS LÁCTEOS**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA LUCIA MASSON  
Setor de Tecnologia, UFPR

  
Dr<sup>a</sup>. ANA CAROLINA MOSCA  
Zhejiang Gongshang University

  
Prof. Dr. BOGDAN DEMCZUK JUNIOR  
Campus Campo Mourão, UTFPR

  
Dr. JOÃO LUIZ ANDREOTTI DAGOSTIN  
PNPD-TC/PPGEAL-UFPR

  
Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO MAFRA  
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 19 de maio de 2016.

## Agradecimentos

Aos meus pais Alice Bigaski Ribeiro e José Ribeiro e ao meu irmão Clewerson por todo o amor e apoio que me dedicam, por serem sempre meus maiores incentivadores e meu porto seguro. Meu amor por vocês não tem tamanho.

Agradeço enormemente a minha orientadora, prof. Dra. Maria Lucia Masson, que sempre confiou na minha capacidade e que se dedicou na orientação desta tese. Agradeço pelos ensinamentos e incentivos, pela amizade e pelo tratamento carinhoso e compreensivo que dedicou a mim em toda essa longa jornada.

Ao prof. Dr. Daniel Granato, por ser uma grande inspiração na minha vida acadêmica desde os tempos de Iniciação Científica, agradeço pelos muitos ensinamentos, pela amizade e pelas conversas sempre incentivadoras.

Je souhaite remercier à PhD. Elisabeth Guichard et PhD. Christian Salles pour m'accepter en étage de doctorat au Centre des Sciences du goût e de l'Alimentation (CSGA), INRA, Dijon.

Je suis reconnaissante à toute l'équipe de CSGA, particulièrement à Charfedinne Ayed, Isabelle Andriot et Chantal Septier pour votre coopération et pour votre soutien et aussi à mes amis et collègues du CSGA, Laura Zabaleta, Julie Rodrigues, Clémence Simart et Rafaella Périco.

Meus sinceros agradecimentos à PhD. Ana Carolina Mosca, por me receber atenciosamente e me ensinar muito sobre o INRA, sobre Dijon e sobre a vida. Agradeço também por aceitar participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) pela oportunidade de realização desta tese e aos professores que participaram da minha formação, especialmente ao prof. Dr. Marcos Rogério Mafra pelos ensinamentos.

Aos professores que participaram das avaliações anteriores deste trabalho e contribuíram com suas significativas sugestões: Dr. Alessandro Nogueira, Dr. Egon

Schnitzler, Dra. Franciny Schmidt e Dra. Nina Waszczyński, assim como aos que aceitaram participar da banca examinadora da tese, prof. Dr. Bogdan Demczuk Junior, prof. Dr. Marcos Rogério Mafra, Dr. João Luiz Andreotti Dagostin e Dra. Ana Carolina Mosca.

À equipe CME pela realização das análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos prof. Dr. Alessandro Nogueira e Dra. Marina Tolentino Marinho, por disponibilizarem a estrutura da Escola Tecnológica de Leites e Queijos dos Campos Gerais para produção dos géis lácteos para algumas análises. Muito obrigada pela confiança e amizade, sempre!

À equipe do GETAFPQ, da UEPG: Cristina Soltovski, Tiago Colman e Prof. Dr. Egon Schnitzler pelo auxílio na realização das análises térmicas.

Aos amigos e colegas do PPGEAL, especialmente ao Gerson (o “*magos dos softwares*”), Alessandra, Manoela e Fernanda, pelas conversas e amizade, e à equipe de pesquisa da prof. Maria Lucia: João, Michele, Eriel, Lucas, Radla, Luciana e Talita, que sempre estiveram prontos a ajudar.

À CAPES pelo apoio financeiro no Brasil e no Exterior e ao Cnpq pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Aos amigos que nos fortalecem e fazem nosso caminho mais feliz, meu sincero agradecimento à Geisi, Alyne, Rubia, Silvia, Bianca, Andrea Lanna e Jean.

GRATIDÃO!

Dedico este trabalho ao meu porto seguro: meus pais Alice e José, que sempre em incentivaram a buscar meus sonhos e que sempre se orgulharam do meu caminho, sem perceber que foram eles, através de seus exemplos de força e coragem que colocaram cada “tijolinho” nesta estrada.



## RESUMO

O ácido lactobiônico (LBA) é um derivado da lactose considerado interessante para a aplicação em alimentos devido propriedades tecnológicas como realçador de sabor, complexante de minerais, conservador, antioxidantes e prebióticas. Entretanto, o efeito de sua utilização é ainda pouco conhecido devido ter sido pouco estudado cientificamente. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar as propriedades do ácido lactobiônico em géis lácteos a fim de elucidar o efeito da sua adição na microestrutura, propriedades mecânicas, estabilidade e na interação com componentes de sabor (sal e aromas), em comparação com um acidificante amplamente utilizado na indústria de produtos lácteos, a glucono- $\delta$ -lactona (GDL). Para isso, foram desenvolvidas cinco formulações de géis lácteos: uma amostra controle sem acidificante, duas amostras utilizando LBA como agente de acidificação e valores de pH 6,2 e 5,5 (HLBA e LLBA, respectivamente) e duas amostras acidificadas com GDL, também com pH 6,2 ou 5,5 (HGDL e LGDL, respectivamente). A estrutura dos géis lácteos foi investigada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), enquanto que suas propriedades mecânicas foram verificadas pelo teste de perfil de textura instrumental (TPA). Os testes de estabilidade envolveram análises de atividade de água ( $a_w$ ), capacidade de retenção de água (CRA) e análise térmica por DSC. O efeito da utilização do ácido lactobiônico na interação com componentes de sabor foi dividida em análises referentes à mobilidade de sódio e liberação de sal *in vitro* e análise de liberação de aromas por CG-FID da composição gasosa de headspace. As principais diferenças encontradas entre os géis lácteos foram para as amostras com pH 6,2, onde a amostra HLBA apresentou diferenças na estrutura, diferenciando-a da amostra com GDL em relação a microestrutura, atividade e capacidade de retenção de água, estabilidade térmica e liberação de aromas. A amostra HGDL apresentou maior liberação de sal *in vitro* em relação à HLBA em função da facilidade de mobilidade de água na sua estrutura. As amostras com pH 5,5 apresentaram diferenças na microestrutura e nas propriedades mecânicas dos géis lácteos, porém tais modificações não foram suficientes para alterar as demais propriedades estudadas. Para a microscopia, propriedades mecânicas, quantificação e mobilidade de sódio ligado e liberação de aromas, houve ainda o efeito do pH. Os resultados obtidos mostram que o ácido lactobiônico pode ser satisfatoriamente utilizado com semelhanças à glucono- $\delta$ -lactona e que pode ser utilizado com o objetivo de melhorar a CRA e diminuir a atividade de água em amostras com alto teor de umidade. Estudos posteriores devem ser realizados para compreender o efeito do LBA na percepção sensorial em alimentos.

Palavras-chave: géis lácteos; microestrutura; mobilidade de sódio, liberação de aromas; agente quelante.



## ABSTRACT

Lactobionic acid (LBA) is a lactose derivative that shows an interesting growth potential in food application due technological properties like flavor enhancer, mineral complexing agent, conservative, antioxidant and prebiotic. However, the effect of lactobionic acid in foods is still little known due a lack of scientific studies. In this way, the present study was aimed at evaluating lactobionic acid characteristics in microstructure, mechanical properties, stability and salt and aroma interaction in dairy gels, in comparison with glucono- $\delta$ -lactone (GDL). In this regard, five formulations of dairy gels were made: a control sample without acid, two gels made with LBA as acidifying agent in pH 6.2 or 5.5 (HLBA and LLBA, respectively) and two samples with GDL in pH 6.2 or 5.5, named HGDL and LGDL, respectively. Dairy gels structure was investigated by scanning electronic microscopy, while mechanical properties were verified by instrumental textural profile analysis. Stability tests were made by water activity test, water holding capacity and by DSC thermal analysis. The effect of lactobionic acid in flavor interaction was divided into sodium mobility and *in vitro* salt release and aroma release by headspace GC-FID. The main differences in dairy gels are related to the samples with pH 6.2, where the use of lactobionic acid changed protein structure, being different of HGDL sample in microstructure, water activity and water holding capacity, thermal stability and aroma release properties. HGDL gel showed higher salt release than others samples due to easy water mobility within the structure. Samples with pH 5.5 showed microstructural and mechanical differences, but these changes have not been sufficient to alter the other properties. A pH effect was also observed for the microscopy, mechanical properties, mobility and quantification of sodium bounded and aroma release analysis. The results obtained show that lactobionic acid can be satisfactorily used in a similar manner to glucono- $\delta$ -lactone and that can be used in order to improve the water holding capacity or reduce water activity in high moisture dairy gels. Additional studies must be performed to understand the LBA effect in food sensorial perception.

Key words: dairy gels; microstructure; sodium mobility; aroma release; chelating agent.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURA MOLECULAR DA $\alpha$ - E $\beta$ -LACTOSE. ....	18
FIGURA 2. PROCESSOS UTILIZADOS NA CONVERSÃO DA LACTOSE EM SEUS DERIVADOS. ....	20
FIGURA 3. CONVERSÃO DA LACTOSE EM ÁCIDO LACTOBIÔNICO.....	21
FIGURA 4. COMPLEXOS FORMADOS PELO ÁCIDO LACTOBIÔNICO COM CROMO EM TRÊS CONFORMAÇÕES ESTRUTURAIS. ....	23
FIGURA 5. COMPLEXO FORMADO ENTRE ÍONS CÁLCIO E O ÁCIDO LACTOBIÔNICO (LACTOBIONATO DE CÁLCIO).....	23
FIGURA 6. ESTRUTURAS QUÍMICAS DA GLUCONO- $\delta$ -LACTONA E DO ÁCIDO LACTOBIÔNICO, RESPECTIVAMENTE. ....	27
FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA DO SORO $\alpha$ -LACTALBUMINA.....	33
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA DO SORO $\beta$ -LACTOGLOBULINA (VARIANTE A), ONDE AS FITAS COM LETRAS DE A ATÉ I DENOTAM A ESTRUTURA $\beta$ -BARRIL, EXEMPLIFICANDO A LIGAÇÃO DE UMA MOLÉCULA ANFIFÍLICA (COLESTEROL) COM A BLG. ....	34
FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MICELA DE CASEÍNA E SUAS SUBMICELAS UNIDAS PELO FOSFATO DE CÁLCIO. ....	36
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA K-CASEÍNA EM PARACASEÍNA-K E CASEINOMACROPEPTIDEO. ....	37
FIGURA 11. CURVA FORÇA-TEMPO DA ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA), ONDE A = ÁREA SOB A CURVA; F = FORÇA.....	39
FIGURA 12. MÉTODO EMPREGADO PARA A PRODUÇÃO DOS GÉIS LÁCTEOS. ....	49

FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO DA PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E REFERÊNCIA UTILIZADOS NA ANÁLISE MOBILIDADE DE ÍONS SÓDIO EM RMN $^{23}\text{Na}$ . ....	53
FIGURA 14. ILUSTRAÇÃO DO SISTEMA UTILIZADO NA ANÁLISE DE LIBERAÇÃO DE SAL IN VITRO. ....	54
FIGURA 15. ADAPTAÇÕES NO MÉTODO DE PRODUÇÃO DAS MATRIZES LÁCTEAS PARA A ANÁLISE DE LIBERAÇÃO DE AROMAS. ....	56
FIGURA 16. MODELO LÁCTEO PRODUZIDO COM 20% DE CONCENTRADO PROTEICO DE LEITE.....	60
FIGURA 17. MICROGRAFIAS DOS GÉIS LÁCTEOS OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, ONDE AS AMOSTRAS CORRESPONDEM A: (A) CONTROLE; (B) HGDL (C) HLBA (D) LGDL (E) LLBA.....	62
FIGURA 18. PROPRIEDADES MECÂNICAS DE DUREZA, ADESIVIDADE E COESIVIDADE OBTIDAS PELO PERFIL DE TEXTURA INSTRUMENTAL (TPA) DOS GÉIS LÁCTEOS. ....	67
FIGURA 19. CURVAS DE CONGELAMENTO E AQUECIMENTO DO DSC PARA OS GÉIS LÁCTEOS. ....	69
FIGURA 20. TERMOMICROSCOPIA DA AMOSTRA CONTROLE, COM AUMENTO DE 800 VEZES, DURANTE A ANÁLISE DE DSC, ILUSTRANDO (1) AMOSTRA ANTES DO INÍCIO DA ANÁLISE; (2) AMOSTRA CONGELADA; (3) INÍCIO DA EVAPORAÇÃO DA ÁGUA; (4) FINAL DA EVAPORAÇÃO E (5) CARACTERÍSTICA FINAL DA AMOSTRA. AUMENTO = 800 VEZES. ....	70
FIGURA 21. LIBERAÇÃO DE AROMA REPRESENTADA PELA RELAÇÃO ENTRE A ÁREA DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS (CG-FID) DOS GÉIS LÁCTEOS HGDL, HLBA, LGDL E LLBA, E A ÁREA DA AMOSTRA CONTROLE.....	78
FIGURA 22. GRÁFICO DE DISPERSÃO PC1 vs. PC2 PARA OS GÉIS LÁCTEOS EM FUNÇÃO DAS ANÁLISES DE LIBERAÇÃO DE SAL E AROMA E DE MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E NO pH. ....	81

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DAS MATRIZES LÁCTEAS. ....	48
TABELA 2. CARACTERÍSTICAS DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS ADICIONADOS AS MATRIZES LÁCTEAS PARA AROMATIZAÇÃO.....	55
TABELA 3. CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO OU GLUCONO- $\delta$ -LACTONA NECESSÁRIOS PARA PRODUIR GÉIS LÁCTEOS COM pH 6,2 OU 5,5, EM FORMULAÇÕES COM 12 E 20% DE CPL.....	59
TABELA 4. CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA E ATIVIDADE DE ÁGUA DOS GÉIS LÁCTEOS. ....	65
TABELA 5. RESULTADOS DO EVENTOS TÉRMICOS: (1) CRISTALIZAÇÃO DA ÁGUA, (2). FUSÃO DA ÁGUA, (3 E 4) DESIDRATAÇÃO, OBTIDOS POR DSC DOS GÉIS LÁCTEOS. ....	71
TABELA 6. QUANTIFICAÇÃO E MOBILIDADE DOS ÍONS DE SÓDIO NOS GÉIS LÁCTEOS OBTIDOS POR RMN $^{23}\text{Na}$ E LIBERAÇÃO DE SAL IN VITRO (LS) NOS TEMPOS 1 MIN E 60 MIN.....	75

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALA	$\alpha$ -lactalbumina
BLG	$\beta$ -lactoglobulina
CCP	Fostato de cálcio coloidal
CG-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
CLSM	Microscopia confocal a laser
CRA	Capacidade de retenção de água
CRF	<i>Code of Federal Regulations</i>
DQF	<i>double quantum filtered</i>
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
FDA	Food and Drug Administration
GDL	Glucono- $\delta$ -lactona
HGDL	Géis acidificados com GDL até pH 6,2 (High pH)
HLBA	Géis acidificados com LBA até pH 6,2 (High pH)
LBA	Ácido lactobiônico
LGDL	Géis acidificados com GDL até pH 5,5 (low pH)
LLBA	Géis acidificados com LBA até pH 5,5 (low pH)
LS	Liberação de sal <i>in vitro</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MWCO	Molecular weight cut-off
p.f.	Ponto de fusão
PCA	Análise de componentes principais
PHA	Poli-hidroxiácidos
pK <sub>a</sub>	Logaritmo da constante de acidez
RMN Na <sup>23</sup>	Ressonância Magnética Nuclear para os núcleos de sódio
SQ	<i>single quantum</i>
TPA	Perfil de textura
VOC	Compostos orgânicos voláteis

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\tau^{opt}$	Tempo de criação do sinal RMN
$T_2$	Tempo de relaxação transversal
$T_{2f}$	Tempo de relaxação transversal externo
$T_{2s}$	Tempo de relaxação transversal interno
$T_c$	Temperatura de conclusão
$T_{onset}$	Temperatura de início do evento térmico
$T_{pico}$	Temperatura de pico
$\Delta H$	Variação de entalpia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1	LACTOSE E SEUS DERIVADOS .....	18
3.2	ÁCIDO LACTOBIÔNICO.....	21
3.2.1	Ácido lactobiônico em alimentos .....	24
3.2.2	Ácido lactobiônico vs. glucono- $\delta$ -lactona.....	26
3.3	MODELOS LÁCTEOS.....	28
3.3.1	Modelos lácteos produzidos por coagulação enzimática.....	32
3.3.1.1	Proteínas do leite.....	32
3.3.1.2	Coagulação enzimática .....	36
3.4	ESTUDOS ESTRUTURAIS NOS MODELOS LÁCTEOS .....	37
3.4.1	Importância das propriedades mecânicas em alimentos.....	37
3.4.1.1	Considerações sobre a Análise de Perfil de textura instrumental (TPA) ....	38
3.5	LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS DE SABOR EM MODELOS LÁCTEOS. ....	41
3.5.1	Liberação de sal .....	41
3.5.2	Análise molecular de mobilidade de sódio em RMN $^{23}\text{Na}$ .....	42
3.5.3	Liberação de aromas .....	43
3.6	ESTABILIDADE DOS MODELOS LÁCTEOS .....	45
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
4.1	MATERIAL .....	47
4.2	MÉTODOS .....	47
4.2.1	Ensaio Preliminares .....	47
4.2.2	Preparação dos géis lácteos .....	47
4.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	49



4.2.4	Capacidade de Retenção de Água (CRA) dos géis lácteos. ....	50
4.2.5	Análise de atividade de água ( $a_w$ ).....	51
4.2.6	Análise do perfil de textura .....	51
4.2.7	Calorimetria exploratória diferencial dos géis lácteos.....	51
4.2.8	Mobilidade e liberação de sal nas matrizes lácteas.....	52
4.2.8.1	Análise de mobilidade iônica de sódio por RMN $^{23}\text{Na}$ . ....	52
4.2.8.2	Liberação de sal <i>in vitro</i> .....	54
4.2.9	Aromatização dos géis lácteos .....	55
4.2.10	Liberação de aroma.....	57
4.2.11	Análise Estatística .....	58
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
5.1.1	Ensaio Preliminares .....	59
5.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	61
5.1.3	Análises da atividade de água e capacidade de retenção de água nos géis.....	65
5.1.4	Análises das propriedades mecânicas dos géis lácteos.....	67
5.1.5	Estabilidade térmica dos géis lácteos.....	69
5.1.6	Efeito na mobilidade e liberação de sal <i>in vitro</i> nas matrizes lácteas. ....	75
5.1.7	Liberação de aroma.....	77
5.1.8	Análise de componentes principais (PCA) para a liberação de sal e aroma nos géis lácteos.....	80
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS .....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
	<b>APÊNDICE I.....</b>	<b>105</b>
	<b>APÊNDICE II.....</b>	<b>107</b>
	<b>APÊNDICE III.....</b>	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que a produção mundial de queijos atinja a marca de 25 milhões de toneladas até 2020 (MIKKELSEN, 2014). Consequentemente, a quantidade de soro descartado também cresce, pois para cada quilo de queijo produzido, cerca de nove quilos de soro são gerados (SCHUCK, 2011). O soro de leite, contudo, apesar de apresentar rica composição nutricional, é muitas vezes encaminhado para a alimentação animal, utilizado como fertilizante ou ainda descartado irregularmente devido as dificuldades na sua industrialização.

A subutilização do soro de leite gera prejuízos financeiros e ambientais, porém, atualmente, o mercado de produtos lácteos vem descobrindo nesta matéria-prima um nicho comercial ainda pouco explorado: a transformação da lactose contida no soro em novos produtos com aplicações industriais e maior valor de mercado.

Entre os inovadores derivados da lactose destaca-se o ácido lactobiônico (LBA). Obtido pela oxidação da lactose, o LBA vem sendo considerado com interesse por grandes indústrias do setor de insumos e aditivos alimentares por suas possíveis aplicações como acidificante, umectante, quelante de minerais, melhorador de sabor, antioxidante e prebiótico.

As pesquisas desenvolvidas na atualidade em relação ao ácido lactobiônico têm como objetivo a otimização de sua obtenção ou estão relacionados às áreas médica e farmacêutica, e, sendo assim, os reais efeitos da utilização do LBA em alimentos permanecem desconhecidos, visto que poucos estudos foram realizados neste sentido para comprovar suas alegações funcionais. Devido a ainda pouca literatura sobre o LBA, a comparação à glucono- $\delta$ -lactona (GDL), agente acidificante amplamente utilizado na indústria láctea, pode auxiliar o estudo do novo aditivo.

Ácidos, como LBA e GDL, são capazes de alterar a conformação da rede de caseína dos derivados lácteos e, assim, suas estruturas. Por sua vez, a microestrutura dos alimentos está diretamente relacionada às suas características sensoriais e de estabilidade dos produtos, com destaque para questões ligadas à mobilidade e liberação de sal e aromas em alimentos.

Atualmente a aplicação do LBA em testes sensoriais não está totalmente regulamentada no Brasil ou na França, onde os experimentos desta tese foram realizados. Desta forma, o presente trabalho buscou compreender como a adição do ácido lactobiônico pode modificar as propriedades estruturais de géis lácteos e como

estas alterações podem influenciar a estabilidade e a liberação de sal e aromas *in vitro* nos géis.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- *Comparar* o efeito da adição do ácido lactobiônico ao da glucono- $\delta$ -lactona em géis lácteos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Desenvolver* géis lácteos acidificados com ácido lactobiônico ou glucono- $\delta$ -lactona em diferentes valores de pH;

- *Verificar* as alterações microestruturais na rede proteica dos géis através de microscopia eletrônica de varredura;

- *Avaliar* o efeito da acidificação com ácido lactobiônico na atividade de água e na capacidade de retenção de água dos géis lácteos;

- *Analisar* o efeito da adição de ácido lactobiônico nas características mecânicas dos géis lácteos;

- *Verificar* a estabilidade térmica dos géis lácteos acidificados com ácido lactobiônico ou glucono- $\delta$ -lactona;

- *Comparar* o efeito do ácido lactobiônico na mobilidade e liberação de sal *in vitro* em relação aos géis lácteos acidificados com glucono- $\delta$ -lactona;

- *Comparar* qualitativamente a liberação de aromas nas matrizes acidificadas com ácido lactobiônico ou glucono- $\delta$ -lactona;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 LACTOSE E SEUS DERIVADOS

A lactose (4-o- $\beta$ -galactopiranosil-D-glicopirranose) é um dissacarídeo redutor constituído por uma molécula de D-glicose unida à outra de D-galactose por uma ligação glicosídica  $\beta 1 \rightarrow 4$ , podendo ser encontrada nas formas estruturais anoméricas  $\alpha$  e  $\beta$  (FIGURA 1). A única fonte significativa de lactose é o leite, onde podem ser encontradas concentrações distintas de acordo com a espécie de mamífero. Nos leites bovino, bubalino, ovino e caprino a lactose encontra-se em quantidades em torno de 4,8; 4,8; 4,6 e 4,1% (m/m), respectivamente (FUQUAY, FOX e MCSWEENEY, 2011).

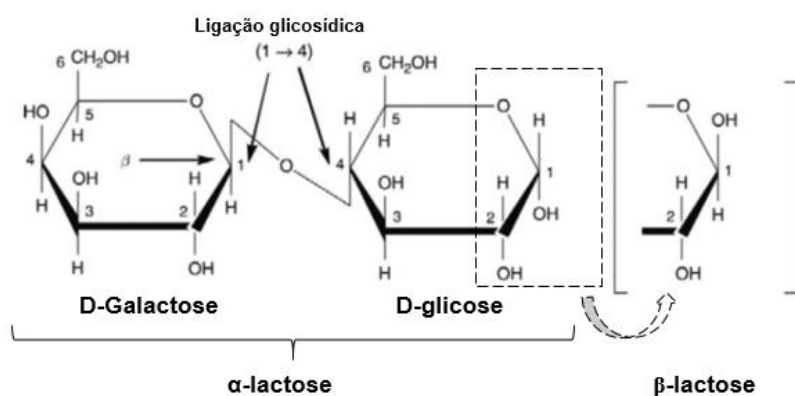


FIGURA 1. ESTRUTURA MOLECULAR DA  $\alpha$ - E  $\beta$ -LACTOSE.  
FONTE: ADAPTADO DE FOX (2011).

A lactose é um coproduto da produção de queijo e caseína, onde o soro extraído destas produções apresenta, em média, cerca de 6,5% de sólidos, dos quais aproximadamente 4,5% é lactose (BYLUND, 2015). Na produção de queijos, quando não ocorre a fermentação da lactose (conversão da lactose em ácido láctico por bactérias lácticas), a maior parte deste carboidrato é eliminada com o soro devido estar dispersa na fração aquosa como uma solução verdadeira, não podendo ser separada por filtração ou decantação (SEKI e SAITO, 2012; BYLUND, 2015).

Industrialmente, a lactose é produzida através de tecnologias complexas de purificação, utilizando processos de ultrafiltração por membranas, cristalização e secagem (SCHUCK, 2011). Porém, devido a lactose apresentar uma estrutura hemi-

acetálica que permite mutarrotação entre anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  (FIGURA 1), que apresentam características distintas entre si, é difícil prever a funcionalidade da lactose produzida, exigindo que a composição do soro, sua concentração e pH sejam estreitamente controlados (CHANDRAPALA, WIJAYASINGHE e VASILJEVIC, 2016).

A lactose purificada é o principal produto industrial derivado do soro de leite, porém, mesmo assim, apenas cerca de 14% de toda a lactose que poderia ser extraída do soro é obtida atualmente (PATERSON, 2011). Este produto tem como destino principal no setor alimentício a aplicação como ingrediente em bebidas, produtos de panificação e confeitaria e alimentos infantis, proporcionando características de textura e coloração aos produtos, seja de forma direta ou por meio da participação em reações como a de Maillard para a formação de coloração caramelo (BEMILLER e HUBER, 2010). A lactose pode, ainda, participar de processos fermentativos para formação de diversos derivados como ácido láctico e etanol (SILVA *et al.*, 2015a).

Mesmo com importante aplicação na indústria de alimentos, a utilização da lactose como aditivo alimentar apresenta algumas limitações devido suas características (SEKI e SAITO, 2012; BYLUND, 2015). Entre elas, a doçura da lactose, considerada baixa por corresponder à apenas 16% da doçura da sacarose, é um limitante quanto a sua utilização como agente edulcorante (FOX, 2011). Além disso, a lactose apresenta reduzida solubilidade, o que leva a produção de cristais com tamanho entre 10 e 16  $\mu\text{m}$  em produtos como o leite condensado. Os cristais formados são suficientemente grandes para serem percebidos sensorialmente e conferir aos alimentos a sensação “arenosa”, pouco apreciada pelos consumidores (GÄNZLE, HAASE e JELEN, 2008; FUQUAY, FOX e MCSWEENEY, 2011). O tamanho dos cristais de lactose pode também interferir em processos tecnológicos por influenciar as propriedades físicas da matéria-prima como coloração, densidade, fluidez e escoamento; e ainda nas propriedades de reidratação, dispersão, umectação e instantização da lactose em pó (SCHUCK, 2011).

Além dos motivos tecnológicos e sensoriais, há ainda a limitação do consumo de produtos contendo lactose devido problemas de intolerância digestiva a este carboidrato. Cerca de 75% da população mundial adulta apresenta distúrbios intestinais devido à ausência da enzima  $\beta$ -galactosidase, que é responsável pela hidrólise da lactose no intestino delgado (DEKKER e DAAMEN, 2011).

Na atualidade, apenas uma pequena quantidade da lactose produzida é convertida em seus derivados (AFFERTSHOLT, 2010), entretanto, devido ao maior retorno financeiro que estes produtos representam, é grande o número de pesquisadores e indústrias engajados no estudo de novas técnicas de obtenção e purificação para os produtos que provém da lactose como nos estudos relatados por Gänzle (2012), Alonso, Rendueles e Díaz (2013), Rentschler *et al.*, (2015) e Silvério *et al.* (2015).

A lactose pode ser convertida em diversos derivados pela aplicação de diferentes processos, como a redução para a geração de lactitol, a transgalactosilação para formar galacto-oligossacarídeos, a transfrutossilação que resulta em lactosucrose, a isomerização para produção de lactulose e a oxidação para obtenção do ácido lactobiônico (GÄNZLE, HAASE e JELEN, 2008), como ilustrado na FIGURA 2.

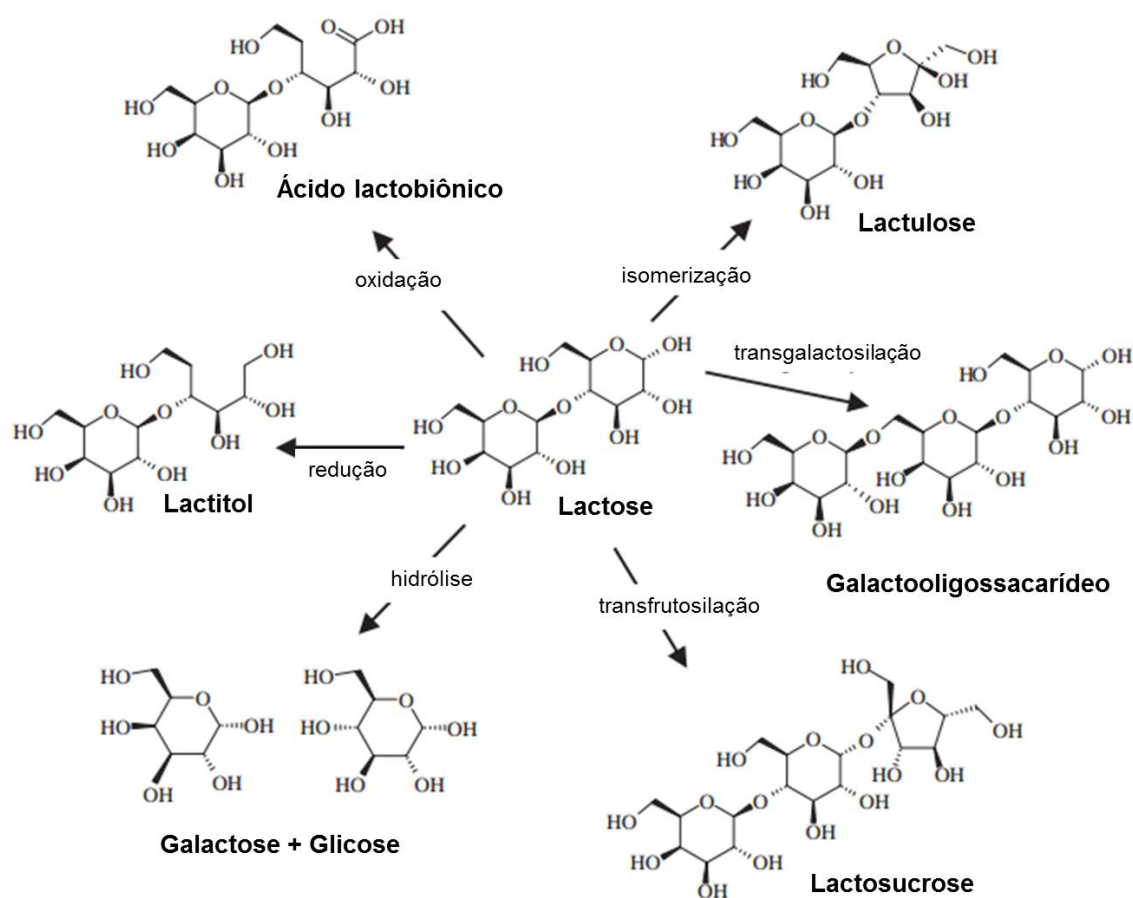


FIGURA 2. PROCESSOS UTILIZADOS NA CONVERSÃO DA LACTOSE EM SEUS DERIVADOS. FONTE: GÄNZLE, HAASE e JELEN (2008).

Alguns dos derivados da lactose já estão estabelecidos industrialmente, com produção regular e aplicações definidas, como é o caso da lactulose e dos galactooligosacarídeos (GOS), reconhecidos como produtos prebióticos utilizados amplamente em formulações de alimentos infantis ou com apelos funcionais (SEKI e SAITO, 2012). Embora o lactitol, a lactosucrose e o ácido lactobiônico também tenham sido reportados como prebióticos e benéficos à saúde intestinal, as pesquisas para estes derivados ainda estão sendo desenvolvidas para maior compreensão sobre suas propriedades (SAARELA *et al.*, 2003; VENEMA, 2012; GARCÍA-CAYUELA *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015).

Propriedades tecnológicas e sensoriais também podem ser atribuídas aos derivados da lactose, como a capacidade crioprotetora e edulcorante do lactitol (HERRERA e MACKIE, 2004; BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.*, 2015). Entretanto, entre os derivados citados, o ácido lactobiônico é o que possui mais atribuições tecnológicas com possibilidade de utilização na indústria de alimentos, como propriedades umectantes, de melhorador de sabor, antioxidante e quelante (GUTIÉRREZ, HAMOUDI e BELKACEMI, 2012).

### 3.2 ÁCIDO LACTOBIÔNICO

O ácido lactobiônico (4-O-β-D-galactopiranosil-D-ácido glucônico) é um ácido orgânico obtido através da oxidação da molécula de glicose que compõe a lactose (FIGURA 3) (SEKI e SAITO, 2012).

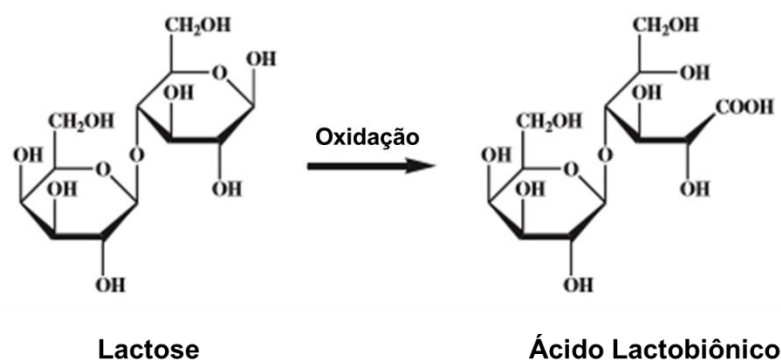


FIGURA 3. CONVERSÃO DA LACTOSE EM ÁCIDO LACTOBIÔNICO.  
FONTE: GUTIÉRREZ, HAMOUDI e BELKACEMI (2012).



A conversão da lactose em ácido lactobiônico (LBA) pode ser realizada por vias químicas, eletroquímica e biocatalítica de oxidação (FOX, 2011). As primeiras produções de LBA foram feitas pela via química, porém este método era inviabilizado pelos altos custos de produção e pela geração de resíduos tóxicos de difícil purificação (QUITMANN, FAN e CZERMAK, 2014).

Nas últimas décadas, com as descobertas sobre as possibilidades de aplicações do LBA nas indústrias farmacêutica e de alimentos, os métodos de bioconversão, utilizando microrganismos e/ou suas enzimas foram impulsionados, por serem mais econômicos e eficientes (GUTIÉRREZ, HAMOUDI e BELKACEMI, 2012). Neste sentido, a maior parte das pesquisas científicas realizadas atualmente sobre o ácido lactobiônico está voltada para sua obtenção de forma a aumentar o rendimento produtivo, a fim de possibilitar maior disponibilidade do produto no mercado com menores custos industriais (DHARIWAL, MAVROV e SCHROEDER, 2006; PEDRUZZI, SILVA e RODRIGUES, 2008; ALONSO, RENDUELES e DÍAZ, 2011; PEDRUZZI, SILVA e RODRIGUES, 2011; KIRYU *et al.*, 2012; ALONSO, RENDUELES e DÍAZ, 2013; GUTIÉRREZ *et al.*, 2013; ALONSO, RENDUELES e DÍAZ, 2015).

Por apresentar a estrutura de um carboidrato ligado a um ácido aldônico, o ácido lactobiônico (LBA) é classificado como um ácido aldobiônico. Os ácidos aldobiônicos, por sua vez, são caracterizados por apresentarem duas ou mais hidroxilas ligadas aos carbonos em suas moléculas, sendo considerados, desta forma, como poli-hidroxiácidos, o que confere diversas funcionalidades aos compostos como características higroscópicas, de retenção de água e de formação de gel (GREEN, YU e VAN SCOTT, 2009).

A estrutura de poli-hidroxiácido concede ao ácido lactobiônico a capacidade antioxidante e de sequestrante de íons divalentes, reagindo por meio dos oxigênios dos grupos carboxílico e das  $\alpha$ -hidroxilas (MENABUE, SALADINI e UGOLETTI, 1998). O LBA foi relatado em estudos como forte quelante de íons, com estabilidade, para cromo (ROLDÁN *et al.*, 2004), cobre (BOUHSINA *et al.*, 1991), cálcio (ABBADI *et al.*, 1999), níquel (MENABUE, SALADINI e UGOLETTI, 1998) e ferro (ISAACSON *et al.*, 1993), formando complexos solúveis como os mostrados nas FIGURAS 4 e 5 com íons cromo e cálcio, respectivamente.

A utilização do LBA como quelante apresenta diversos objetivos. Para o cromo, Roldán *et al.* (2004) concluíram que o ácido lactobiônico pode atuar como

sequestrante de íons reativos do metal cromo, que são considerados carcinogênicos e mutagênicos. No caso do cálcio, o LBA é utilizado como carreador do mineral até este ser absorvido no intestino, melhorando sua a suplementação no organismo (QUITMANN, FAN e CZERMAK, 2014).

A capacidade antioxidante conferida ao ácido lactobiônico também é considerada função da capacidade quelante, pois é atribuída ao sequestro dos íons ferro que participam da produção de radicais livres (PLAYNE e CRITTENDEN, 2009). Além disso, a formação de complexos minerais altera o tamanho dos sistemas onde o LBA está incluído, contribuindo para mudanças nas interações com outras moléculas (ROLDÁN *et al.*, 2004).

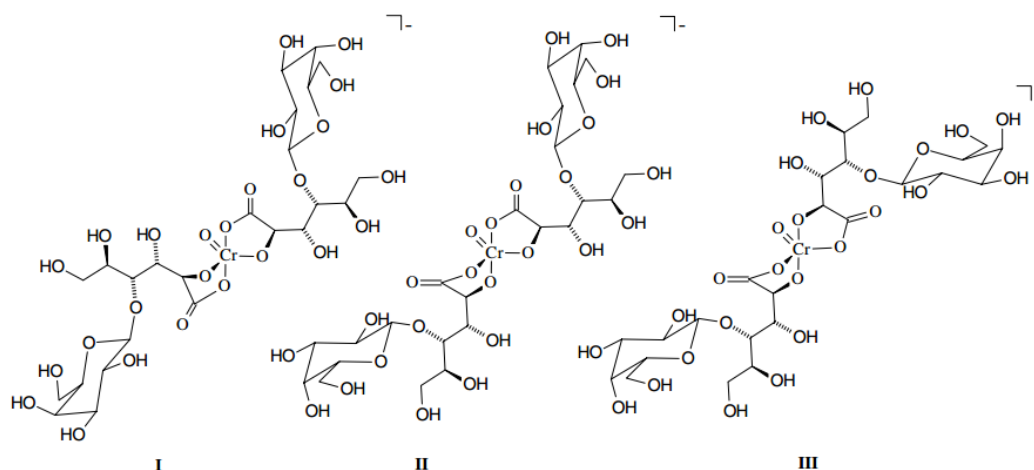


FIGURA 4. COMPLEXOS FORMADOS PELO ÁCIDO LACTOBIONIÇO COM CROMO EM TRÊS CONFORMAÇÕES ESTRUTURAIS.  
FONTE: ROLDÁN *et al.* (2004).

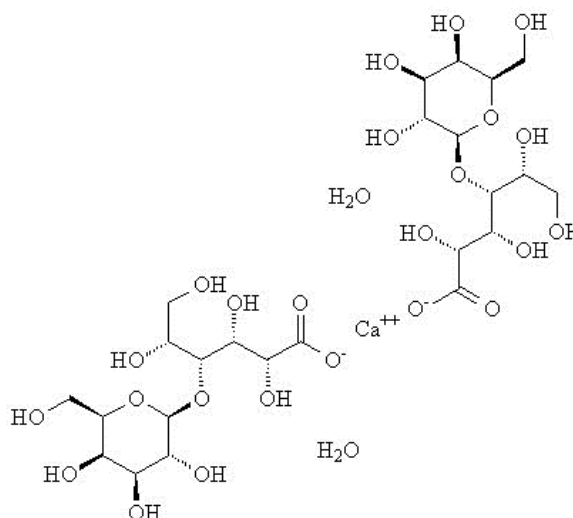


FIGURA 5. COMPLEXO FORMADO ENTRE ÍONS CÁLCIO E O ÁCIDO LACTOBIONIÇO (LACTOBIONATO DE CÁLCIO).  
FONTE: ABBADI *et al.* (1999).

Apesar do LBA ainda ser pouco estudado cientificamente, há diversas propriedades já estabelecidas para este ácido orgânico e muitos pesquisadores engajados em estudos para novas descobertas. Muito se tem desenvolvido na área farmacêutica, onde pesquisas vem apontando o eficiente uso de LBA em formulações medicamentosas de antitrombóticos (RAAKE *et al.*, 1989; KIJOWSKI *et al.*, 1994), como carreador de drogas para tratamentos de doenças hepáticas, entre elas o câncer de fígado (CHEN *et al.*, 2015; FU *et al.*, 2015; DU *et al.*, 2016; LV *et al.*, 2016), no tratamento de dermatites (JANG *et al.*, 2016; SAKAI *et al.*, 2016), na supressão de substâncias conhecidas como promotoras de progressão de tumores e de obesidade (MUKHERJEE e YUN, 2015), e também na área cosmética em tratamentos anti-idade (GREEN, YU e VAN SCOTT, 2009).

Na área de alimentos, os estudos ainda são limitados a poucos testes e alegações, principalmente devido ao ácido lactobiônico ainda não ser totalmente regulamentado como aditivo alimentar em grande parte do mundo, como nos países da Europa e na América Latina, impossibilitando testes sensoriais em humanos. Entretanto, a FDA (Food and Drug Administration), agência reguladora de alimentos nos Estados Unidos, permite a utilização de LBA na forma de lactobionato de cálcio (FIGURA 5) em alimentos para consumo humano (CFR, 2015). Mesmo assim, há diversas aplicações e patentes registradas para o uso de ácido lactobiônico em alimentos, que serão detalhados na seção a seguir (3.2.1).

### 3.2.1 Ácido lactobiônico em alimentos

A única fonte natural de ácido lactobiônico relatada em alimentos é o iogurte do Mar Cáspio ou iogurte Caucásico, produto amplamente consumido no Japão há muitas décadas, semelhante ao Kefir. Estudos apontam que, dentre os diversos microrganismos envolvidos na obtenção deste iogurte, o *Acetobacter orientalis* é o responsável pela produção de LBA no produto, por sua atividade de lactose-oxidase (KIRYU *et al.*, 2009; KIRYU *et al.*, 2012).

A maior parte dos trabalhos realizados visando a aplicações do ácido lactobiônico em alimentos é encontrada na forma de patentes. Inúmeros projetos já foram patenteados em diversas áreas, como a de produtos lácteos, cárneos, de panificação, confeitaria e complementação mineral. Há patentes utilizando o ácido lactobiônico na indústria de alimentos desde 1960, quando Broquist, Alvin e

Winterbottom (1960) registraram a utilização do LBA como melhorador da solubilidade de antibióticos na solução aquosa aplicada no tratamento de frangos eviscerados, a fim de promover o aumento da vida de prateleira da carne de aves.

Em 2004, Akashe *et al.* (2007) criaram um complexo mineral para fins de fortificação mineral de alimentos utilizando o ácido lactobiônico como carreador de cálcio e/ou outros minerais como ferro, zinco e selênio, sem afetar as propriedades sensoriais de bebidas e alimentos.

Um dos primeiros projetos utilizando o LBA na tecnologia de alimentos foi realizado por Nielsen (2005), que registrou patentes sobre a utilização de ácido lactobiônico em carnes. O autor relatou benefícios da utilização do LBA na preservação da umidade em produtos cárneos, onde houve menor perda de água nas operações de congelamento, descongelamento e cozimento destes produtos. Em 2006, o mesmo autor depositou patente de uma bebida não-láctea com utilização de lactobionato de cálcio, sal obtido a partir de ácido lactobiônico, com a finalidade de enriquecimento de cálcio na dieta por meio de um produto agradável ao paladar, podendo ser utilizado em sucos de frutas, chás, refrigerantes, café e bebidas alcoólicas como vinho e cerveja (NIELSEN, 2006).

A fim de diminuir a acidez perceptível e melhorar a firmeza de produtos lácteos fermentados, como iogurtes e queijos, Lynglev *et al.* (2007), em patente depositada pela Novozymes S.A. (Dinamarca), utilizaram uma enzima oxidase produzida pelo fungo *Microdochium nivale* para obter ácido lactobiônico nos produtos estudados, atingindo o objetivo de melhoramento de características de firmeza e sabor.

Ainda em relação a produtos lácteos, a Kraft Foods R&D, por meio do invento de Bradbury *et al.* (2002), realizou registro de patente sobre o processo de fabricação de queijos de coagulação ácida ou enzimática, moles, semi-duros e duros, entre outros produtos lácteos, com a adição de ácido lactobiônico ou com a geração *in situ* deste ácido por meio de enzima desenvolvida por Chr. Hansen S/A.

Em 2009, Nielsen e Hoeier (2009) propuseram a injeção através de agulhas ou jatos como um novo mecanismo de introdução de ácido lactobiônico em queijos. Segundo os autores, este método permite menor perda de ácido lactobiônico no processo e pode este ser aplicado em queijos de massa filada como a muçarela, sem prejuízo às propriedades de elasticidade e derretimento e com notável aumento de rendimento na produção. Nielsen e Hoeier (2009) também utilizaram a técnica de injeção de ácido lactobiônico em massas de pães e biscoitos.

Walter e Begli (2011) patentearam a aplicação do ácido lactobiônico como realçador de sabor para utilização em alimentos ou bebidas, destacando os sabores/gostos ácido, frutado, doce, umami e salgado. Por outro lado, neste trabalho, o ácido lactobiônico não aumentou a percepção do gosto amargo, mas foi capaz de mascarar este gosto em adoçantes a base de estévia.

Em outro trabalho sobre a capacidade de melhoramento do sabor em alimentos, Kurihara *et al.* (1995) utilizaram o ácido lactobiônico apenas como estabilizador das propriedades de modificação de sabor da curculina, proteína extraída da planta *Curculigo latifolia*.

Além das propriedades tecnológicas, o ácido lactobiônico é apontado como um potencial prebiótico. Diversos estudos neste sentido foram realizados. No trabalho realizado por Saarela *et al.* (2003), o ácido lactobiônico não apresentou capacidade de melhorar as propriedades funcionais de cepas de *Lactobacillus salivarius*, contudo, foi eficiente para *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. Para Kontula *et al.* (1999), LBA não apresentou capacidade prebiótica pois não desenvolveu cepas de *L. acidophilus*. Entretanto, no estudo de Adebola, Corcoran e Morgan (2014), o ácido lactobiônico, assim como a lactulose e ao contrário da inulina, protegeu significativamente *L. acidophilus* NCFM de ácido biliares (2 mM).

Com base nas amplas possibilidades de aplicações do ácido lactobiônico expostas nesta revisão, como acidulante, quelante, realçador de sabor, retentor de água e prebiótico, bem como no ainda superficial estudo de suas propriedades em alimentos, destaca-se a importância das pesquisas em torno deste carboidrato.

Novos estudos para poder sugerir outras utilizações do ácido lactobiônico no setor alimentício devem ser realizadas, abordando principalmente questões ligadas à segurança alimentar e o efeito que a utilização do LBA produz a componentes de alimentos.

### 3.2.2 Ácido lactobiônico vs. glucono-δ-lactona

Glucono-δ-lactona (GDL) é um carboidrato derivado da oxidação da glicose via pentoses-fosfato que apresenta um grupo cíclico, chamado lactona, em sua estrutura. Este ácido se hidrolisa gradualmente em água, formando ácido glucônico e promovendo lento abaixamento do pH (LUCEY *et al.*, 1998).

A GDL é amplamente utilizada para acidificação direta (sem fermentação) na produção de derivados de leite e produtos de soja, para que o pH possa ser regulado mais facilmente (HERR, 2011). Além disso, apresenta diversas aplicações na área cosmetológica como umectante em produtos anti-idade (BERNSTEIN *et al.*, 2004).

Grande parte dos estudos sobre o efeito do pH na estrutura proteica e nas propriedades de produtos lácteos utilizam a glucono- $\delta$ -lactona como agente de acidificação, justamente por ser um método simples de padronização do pH das amostras, sendo utilizado em importantes trabalhos como os realizados por Lucey *et al.* (1997), Schwertfeger e Buchheim, (1998), Feeney, Guinee e Fox (2002), Martin *et al.*, (2009) E Chen *et al.* (2016).

Estruturalmente, GDL e LBA apresentam semelhanças (FIGURA 6), pois, assim como o ácido lactobiônico, a GDL também é classificada como poli-hidroxiácido devido às hidroxilas ligadas aos carbonos de sua estrutura. Contudo, por ter origem de um dissacarídeo, o LBA apresenta massa molecular de 358,3 Da, enquanto a glucono- $\delta$ -lactona, oriundo da glicose, possui 178,14 Da (BURDOCK, 1997; GUTIÉRREZ, HAMOUDI e BELKACEMI, 2012).

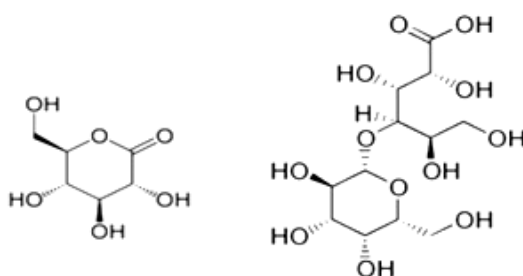


FIGURA 6. ESTRUTURAS QUÍMICAS DA GLUCONO- $\delta$ -LACTONA E DO ÁCIDO LACTOBIONIÇO, RESPECTIVAMENTE.

FONTE: KORNHAUSER, COELHO e HEARING (2010).

Mesmo que ambos os ácidos (GDL e LBA) sejam poli-hidroxiácidos, ou seja, moléculas que possuem dois ou mais grupamentos hidroxila ligados ao carbono, essas hidroxilas são neutras e a característica ácida é provida apenas pelo grupo carboxila, que ambos os ácidos apresentam apenas um (GREEN, YU e VAN SCOTT, 2009). Desta forma, o  $pK_a$  dos dois ácidos é muito próximo, 3,8 para o LBA e 3,7 para a GDL (GUTIÉRREZ, HAMOUDI e BELKACEMI, 2012).

Tecnologicamente, a GDL, assim como o LBA, também apresenta atributos como agente umectante, quelante e antioxidante (GREEN, YU e VAN SCOTT, 2009), porém não há relatos de capacidade prebiótica para o GDL.

Devido às características próximas entre o ácido lactobiônico e a glucono- $\delta$ -lactona, a comparação entre os dois ácidos pode auxiliar o melhor entendimento das propriedades do LBA, bem como, propor utilizações industriais para este novo aditivo, em substituição à GDL quando houver o objetivo de enriquecer os produtos com agentes prebióticos.

### 3.3 MODELOS LÁCTEOS

Nos queijos reais, diversos fatores levam a formação de sistemas complexos, que criam dificuldades na interpretação de resultados de estudos científicos. As respostas podem ser influenciadas pela composição do leite, pelo tipo de coagulante, por enzimas autóctones do leite, bactérias lácticas ou microbiota secundária e suas enzimas (BERESFORD e WILLIAMS, 2004). A fim de minimizar estes interferentes e apresentar respostas com maior confiabilidade sobre as variáveis, modelos análogos a queijo têm sido utilizados no contexto científico.

Os modelos de queijos são uma representação do alimento, formulado e produzido sob condições controladas. Estes modelos são também chamados de géis lácteos ou matrizes lácteas dependendo da sua composição (DE LOUBENS *et al.*, 2011; AYED *et al.*, 2014).

Vários tipos de produtos lácteos podem ser representados por modelos, sendo formulados com diferentes graus de complexidade e para diversos objetivos de estudo, como nos trabalhos de Merabtine *et al.* (2010) e Ayed *et al.* (2014), onde foram utilizados modelos lácteos sem a adição de lipídios para o estudo da liberação de aromas em alimentos livres de gordura, que podem ser associados a iogurtes desnatados. Em estudos como o de Gierczynski *et al.* (2007), Tarrega *et al.* (2008b) e Boisard *et al.* (2014) foram utilizados modelos mais complexos, similares a queijos semi-duros ou frescos para análises sensoriais.

As formulações dos modelos lácteos englobam diferentes ingredientes e formas de produção. Entretanto, a maior parte dos modelos são formados principalmente por proteínas do leite, gordura, sal, acidificante, texturizantes, aromas e quimosina, podendo ser coagulados pelas vias enzimática ou ácida ou ainda



estabilizados por sais fundentes (GIERCZYNSKI *et al.*, 2007; TARREGA *et al.*, 2008a; LAWRENCE *et al.*, 2012b). No QUADRO 1, é possível comparar a formulação de alguns exemplos de modelos lácteos encontrados na literatura, utilizados para pesquisa de diversos parâmetros.

Cada ingrediente adicionado ao modelo lácteo apresenta uma função. As proteínas do leite são as principais responsáveis pela firmeza e estrutura dos modelos, podendo ser utilizado caseínas, caseinatos ou proteínas do soro nas formulações. Outras proteínas, como as de origem vegetal (ex.: soja), e/ou amidos podem ser adicionadas para substituir parte das proteínas do leite em modelos com menor custo.

As gorduras também participam da estruturação dos modelos e modificam suas características aromáticas, podendo ser utilizadas tanto fontes de gordura animal como manteiga, gordura anidra de leite, quanto vegetal, como óleos de girassol ou palma, por exemplo (GUINEE, CARIC e KALAB, 2004).

Entre as utilizações de modelos lácteos na pesquisa científica atual, destacam-se trabalhos como o realizado por Bertrand *et al.* (2015) no qual foram utilizados para o estudo da reação de Maillard durante a estocagem de modelos de queijo, estudos sobre as condições do crescimento microbiano para fungos (MORIN-SARDIN *et al.*, 2016) e para culturas starters (RUGGIRELLO, COCOLIN e DOLCI, 2016), pesquisas sobre novos aditivos (CARVALHO *et al.*, 2015; SOBRAL *et al.*, 2016), sobre alterações no processamento (BOBBO *et al.*, 2016) e acerca de modificação de composição e análise sensorial (BOISARD *et al.* 2014).

Os modelos lácteos tem sido, ainda, importantes ferramentas nos estudos que abordaram a influência da composição na liberação de sal e/ou aromas *in vitro* ou *in vivo*, sendo utilizado por diversos autores como Phan *et al.* (2008), Lauverjat *et al.* (2009), Saint-Eve *et al.* (2009), Boisard *et al.* (2013), Boisard *et al.* (2014) e Mosca *et al.* (2015a).

As características dos modelos lácteos, de reprodutividade e de adequação às necessidades dos estudos, motivam a utilização desta ferramenta na pesquisa sobre o ácido lactobiônico. Com a finalidade de minimizar os interferentes, foram utilizados modelos lácteos simples, análogos a queijos desnatados, coagulados por via enzimática.

QUADRO 1. FORMULAÇÕES E PRINCIPAIS UTILIZAÇÕES DE MODELOS LÁCTEOS.

Tipo de modelo	Principais ingredientes	Variáveis da composição	Parâmetros analisados	Referência
Gel lácteo	Leite desnatado ultrafiltrado, gordura anidra de leite, glucono- $\delta$ -lactona, NaCl e coalho.	Conteúdo de gordura e proteína de leite.	Liberação de sal <i>in vivo</i>	(DE LOUBENS <i>et al.</i> , 2011)
Gel lácteo	Leite desnatado ultrafiltrado, gordura anidra de leite, glucono- $\delta$ -lactona, NaCl, aromas e coalho.	Conteúdo de gordura, sal e matéria-seca.	Liberação de sal e aroma <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	(LAUVERJAT <i>et al.</i> , 2009)
Gel lácteo	Leite desnatado ultrafiltrado, gordura anidra de leite, NaCl e coalho.	Concentração de gordura ou de proteína do leite.	Formação do bolo alimentar	(DRAGO <i>et al.</i> , 2011)
Gel lácteo	Gordura anidra de leite, caseína hidrolisada, sais fundentes, aromas.	Proporção sal/proteína, lipídios/proteína, água/proteína, velocidade de agitação na produção	Liberação de sal e percepção do gosto salgado; mastigação.	(PHAN <i>et al.</i> , 2008)
Imitação de queijo	Caseína hidrolisada, óleo de palma hydrogenado, óleo de colza, amido de milho, NaCl, ácido cítrico, ácido sórbico, sais fundentes.	Concentração e tipo de amido (nativo, resistente, pré-gelatinizado ou ceroso)	Mobilidade de água, derretimento e propriedades reológicas.	(NORONHA <i>et al.</i> , 2008)
logurte modelo	Caseinato, leite em pó, proteínas do soro, gordura, aroma.	Proporção da fração proteica.	Propriedades reológicas microestrutura, liberação de aroma <i>in vitro</i> e percepção.	(SAINT-EVE <i>et al.</i> , 2006)
logurte modelo	Leite desnatado em pó, gordura anidra de leite, açúcar, aromas.	Conteúdo de gordura e matéria-seca.	Efeito da embalagem durante a estocagem na viscosidade e percepção de aromas.	(SAINT-EVE <i>et al.</i> , 2008)

QUADRO 1. FORMULAÇÕES E PRINCIPAIS UTILIZAÇÕES DE MODELOS LÁCTEOS. (CONTINUAÇÃO).

Tipo de modelo	Principais ingredientes	Variáveis da composição	Parâmetros analisados	Referência
Modelo de logurte batido com e sem pectina	Leite em pó, pectina, glucono- $\delta$ -lactona e aromas.	Textura pela adição de diferentes concentrações de pectina.	Liberação de aromas <i>in vitro</i> .	(MERABTINE <i>et al.</i> , 2010; AYED <i>et al.</i> , 2014)
Modelo de queijo semi-duro	Caseína hidrolisada, caseína ácida, gordura anidra de leite, NaCl, ácido cítrico e sais fundentes.	Proporção lipídio/proteína, concentração de sal	Mobilidade de sal, liberação de sal e aroma <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	(BOISARD <i>et al.</i> , 2013; BOISARD <i>et al.</i> , 2014)
Modelo de queijo semi-duro	Caseína hidrolisada, gordura de leite e sais fundentes, NaCl, aromas, CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> , KCl, ácido cítrico e ácido láctico.	Proporção lipídio/proteína, ponto de fusão da gordura e velocidade de agitação na produção.	Propriedades reológicas, liberação de aroma <i>in vivo</i> e mastigação.	(TARREGA <i>et al.</i> , 2008b)
Queijo fresco sem gordura	Caseína micelar, proteínas do soro, lactose, NaCl, extrato de levedura, minerais, culturas iniciadoras, aromas e coalho.	Textura pela adição de diferentes concentrações de quimosina.	Liberação de aroma <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ; Propriedades reológicas.	(GIERCZYNSKI <i>et al.</i> , 2007)
Queijo fresco sem gordura	Proteína de leite, lactose, NaCl, cultura iniciadora, aromas e coalho.	Textura pela adição de diferentes concentrações de quimosina.	Percepção de aroma <i>in vivo</i>	(GIERCZYNSKI, LABOURE e GUICHARD, 2008)
Gel lácteo	Concentrado proteico de leite, glucono- $\delta$ -lactona, sal, coalho.	pH; Concentração de proteína.	Percepção de gosto salgado. Mobilidade de sódio e propriedades reológicas.	(MOSCA <i>et al.</i> , 2015a)

### 3.3.1 Modelos lácteos produzidos por coagulação enzimática

Como observado anteriormente, os modelos lácteos mais frequentemente utilizados são produzidos pela coagulação de proteínas do leite, que ocorre pela ação de enzimas proteolíticas, sendo então, chamada coagulação enzimática. Esta forma de produção de modelos lácteos simula o processo de produção da maioria dos tipos de queijos existentes (SCOTT *et al.*, 2002).

Para a compreensão dos efeitos que as modificações na composição dos modelos lácteos podem causar às redes proteicas, é necessário compreender como estas estão constituídas e como ocorre sua formação. Desta forma, as seções seguintes (3.3.1.1 e 3.3.1.2), descrevem as características das proteínas do leite e o mecanismo de formação da rede proteica por meio da coagulação enzimática.

#### 3.3.1.1 Proteínas do leite

O leite bovino é constituído por aproximadamente 3,6% de proteínas, divididas em dois grupos: as caseínas, que correspondem a 80% das proteínas do leite; e as proteínas do soro, equivalentes a 20%. No pH do leite, entre 6,6 e 6,8, ambas possuem carga líquida negativa nas moléculas (SWAISGOOD, 2009).

O grupo das proteínas do soro é representado, majoritariamente, por duas proteínas:  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina (FIGURA 7 e FIGURA 8). Estas proteínas encontram-se dissolvidas na fração aquosa do leite (soro) e não formam coloides, não se auto associam ou interagem com outras proteínas em solução (SCOTT *et al.*, 2002). Isso ocorre em função da estrutura globular compacta dessas proteínas, onde a distribuição dos resíduos hidrofóbicos é uniforme, possibilitando ligações dissulfeto entre os resíduos de cisteína, o que faz com que as áreas hidrofóbicas fiquem ocultas dentro das suas estruturas (SWAISGOOD, 2009).

A  $\alpha$ -lactalbumina (ALA) (FIGURA 7) tem massa molecular de 14,2 kDa e seu ponto isoelétrico é entre pH 4,2 e 4,5. Sua estrutura é globular e compacta, sendo classificada como uma metaloproteína por formar um complexo com íon  $\text{Ca}^{2+}$  (ORTEGA-REQUENA e REBOUILLAT, 2015). Esta ligação com o cálcio é essencial para o dobramento da proteína, impactando na sua estrutura, estabilidade e hidrofobicidade. Na ausência do mineral, que pode ser removido em pH baixo ou por agentes quelantes, a  $\alpha$ -lactalbumina pode se ligar a compostos hidrofóbicos, contudo,

se as ligações dissulfeto não forem rompidas, esta condição é reversível se o pH é elevado (BREW, 2011).

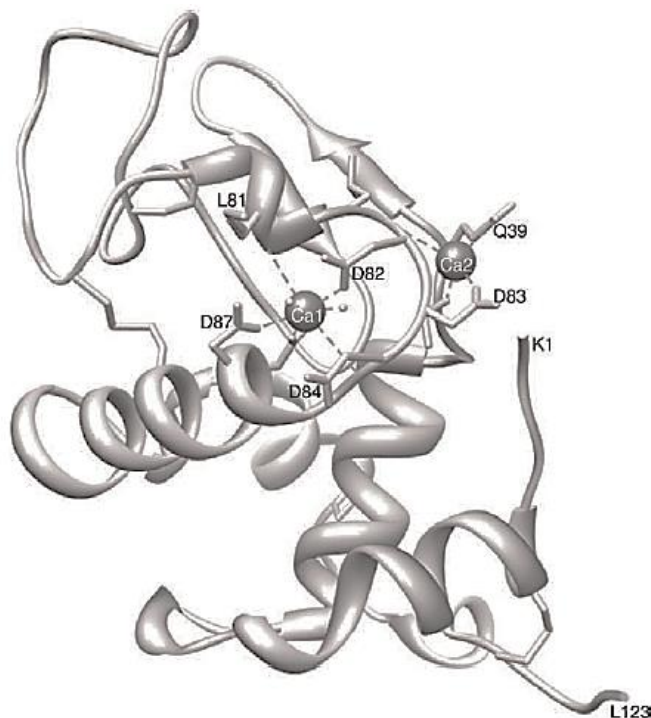


FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA DO SORO  $\alpha$ -LACTALBUMINA.  
FONTE: BREW (2011).

A mais abundante das proteínas do soro bovino é a  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) e, assim como a  $\alpha$ -lactalbumina, é também uma proteína globular. Com 18,3 kDa de massa molecular, apresenta 162 resíduos de aminoácidos e ponto isoelétrico em pH 5,1 (KONTOPIDIS, HOLT e SAWYER, 2004).

A BLG é uma das proteínas mais estudadas e tem estruturas secundária e terciária bem definidas, com uma alfa-hélice de um lado e uma estrutura  $\beta$ -barril (FIGURA 8), que a descreve como uma proteína da família das lipocalinas, que, por sua vez, são caracterizadas pela capacidade de se ligar a pequenas moléculas hidrofóbicas ou a moléculas anfifílicas. A BLG existe como dímero entre pH 3 e 7 e possui três variantes no leite bovino, chamadas A, B e C (SWAISGOOD, 2009).

Em pH baixo, a estrutura da BLG sofre diversas alterações. A volta EF (FIGURA 8), que atua como porta de entrada para o sítio de ligação do  $\beta$ -barril, é fechada e, então, a proteína não pode se ligar facilmente a outras moléculas e as interações são inibidas ou impossíveis. Em pH alto a entrada está aberta e os ligantes

têm pronto acesso à cavidade hidrofóbica da molécula (KONTOPIDIS, HOLT e SAWYER, 2004; CREAMER, LOVEDAY e SAWYER, 2011).

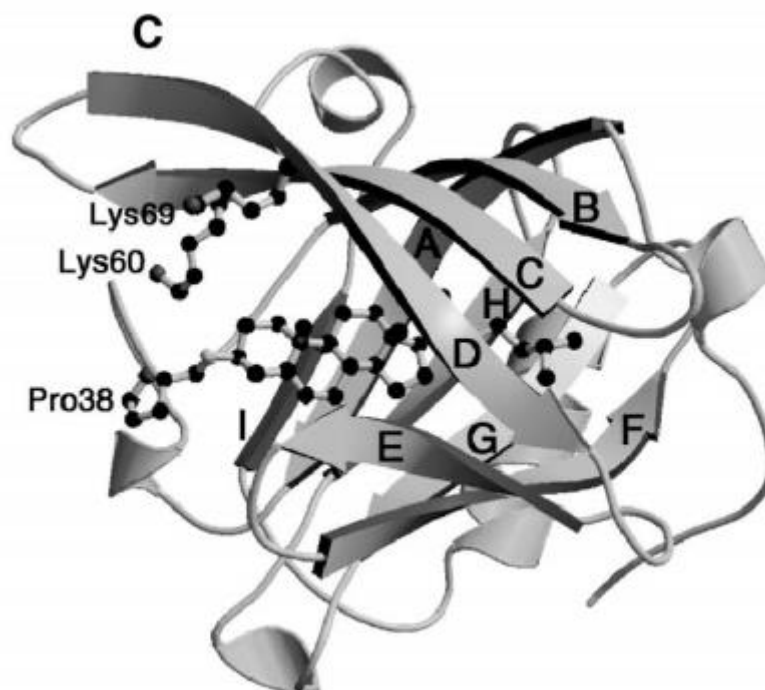


FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA DO SORO  $\beta$ -LACTOGLOBULINA (VARIANTE A), ONDE AS FITAS COM LETRAS DE A ATÉ I DENOTAM A ESTRUTURA  $\beta$ -BARRIL, EXEMPLIFICANDO A LIGAÇÃO DE UMA MOLÉCULA ANFIFÍLICA (COLESTEROL) COM A BLG. FONTE: KONTOPIDIS, HOLT E SAWYER (2004).

As proteínas do soro são reconhecidas pela riqueza biológica devido sua composição de aminoácidos (BYLUND, 2015) e, principalmente a  $\alpha$ -lactalbumina, por ser rica em triptofano, está associada a benefícios à saúde (CITRARO *et al.*, 2011). Embora com alto valor nutricional, a  $\beta$ -lactoglobulina é apontada com a proteína mais alergênica do leite, provavelmente por não ser encontrada no leite humano, o que faz com que o sistema imunológico seja ativado contra esta proteína (ORTEGA-REQUENA e REBOUILLAT, 2015).

As caseínas constituem 80% do total de proteínas no leite bovino. Definidas como fosfoproteínas, são divididas em  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  caseínas. Estruturalmente, todas as frações de caseína se encontram unidas ao fosfato de cálcio em uma estrutura esférica altamente hidratada, conhecida como micela de caseína, como é representado na FIGURA 9 (SWAISGOOD, 2009). Ao contrário das proteínas do soro, as caseínas são bastante estáveis à temperatura, porém, mais sensíveis ao pH e se

tornam instáveis em pH próximo de 5,0 devido à aproximação do seu ponto isoelétrico em 4,6 (HORNE, 2011).

Um dos modelos mais aceitos para a configuração da micela de caseína é o que ela apresenta dois tipos de submicelas: uma contendo as  $\alpha$  e  $\beta$  caseínas, que constitui o núcleo hidrofóbico da micela; e a outra que consiste em  $\alpha$  e  $\kappa$  caseínas, que estão distribuídas na superfície da micela devido à fração hidrofílica da  $\kappa$ -caseína (FIGURA 9) (ORTEGA-REQUENA e REBOUILLAT, 2015).

Como fosfoproteínas, as diferentes frações de caseína possuem diferentes graus de fosforilação. As caseínas  $\alpha$  e  $\beta$  são altamente fosforiladas, enquanto que a  $\kappa$ -caseína contém apenas um ou dois resíduos fosfoeril. Essa característica faz com que as caseínas  $\alpha$  e  $\beta$  tenham forte característica hidrofóbica e de associação com íons divalentes como cálcio e magnésio (HORNE, 2011). Desta forma, a parte interna da micela, composta por caseínas  $\alpha$  e  $\beta$ , se estrutura através de ligações com o cálcio e interações hidrofóbicas, enquanto que a  $\kappa$ -caseína, que não interage com o cálcio devido à falta de resíduos de fosfoerina, só é capaz de realizar interações hidrofóbicas com as demais frações de caseína. Sendo assim, a integridade da micela está relacionada ao balanço entre forças atrativas e repulsivas como atrações hidrofóbicas contra repulsão eletrostática (LUCEY, 2002).

De fundamental importância na estabilização da micela de caseína, o cálcio é encontrado em equilíbrio entre as fases micelar e do soro. Este equilíbrio pode ser alterado pela temperatura, pelo pH ou pela adição de agentes quelante (UDABAGE, MCKINNON e AUGUSTIN, 2000). Na fase aquosa, o cálcio se encontra na forma livre, sendo chamado cálcio iônico, enquanto que na fase micelar ele está presente como fosfato de cálcio coloidal (CCP; do inglês: *colloidal calcium phosphate*), ligado aos resíduos fosfoeril da caseína e, assim, mantendo a estabilidade da micela pela neutralização de grupos carregados das caseínas (KOUTINA *et al.*, 2015). A FIGURA 9 apresenta um esquema com a configuração micelar com suas submicelas e ligações com o fosfato de cálcio coloidal.

Entre as proteínas do leite, são as caseínas que estão envolvidas diretamente na formação dos géis lácteos. Quando a micela perde a sua capacidade de estabilização as interações entre as caseínas são favorecidas, formando uma rede proteica. A desestabilização da micela pode ocorrer por fatores como a adição de ácidos, agentes quelante e enzimas, como no caso da coagulação enzimática que utiliza a quimosina como agente desestabilizador da micela.



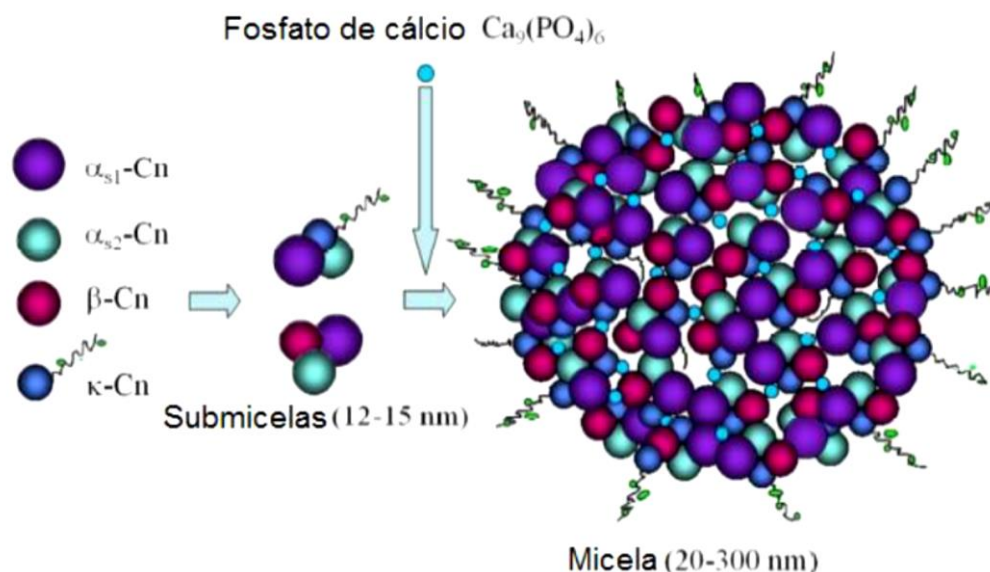


FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MICELA DE CASEÍNA E SUAS SUBMICELAS UNIDAS PELO FOSFATO DE CÁLCIO.  
 FONTE: ORTEGA-REQUENA e REBOUILLAT (2015).

### 3.3.1.2 Coagulação enzimática

Do ponto de vista do processamento de produtos derivados de leite, a capacidade das caseínas de se ligarem com o cálcio é uma das suas características mais importantes (FARRELL, 2011), pois é devido essas ligações que se obtém os géis de leite (HORNE, 2011).

Para que as frações de caseínas  $\alpha$  e  $\beta$  possam se ligar ao cálcio e formar a rede proteica, é necessário que haja a desestabilização da micela. Esta desestabilização ocorre em duas fases. No caso da coagulação enzimática, a primeira fase consiste na ruptura da  $\kappa$ -caseína por proteases, como a quimosina, entre os aminoácidos Fenilalanina-105 e Metionina-106. Esta ruptura divide a  $\kappa$ -caseína em uma parte hidrofóbica que se inicia no N-terminal e encerra na ligação entre os aminoácidos rompidos pela enzima (Phe105-Met106), chamada paracaseína- $\kappa$  e em caseinomacropeptídeo, que é a fração hidrofílica da  $\kappa$ -caseína (SCOTT *et al.*, 2002). A FIGURA 10 ilustra o processo da primeira fase da coagulação enzimática.

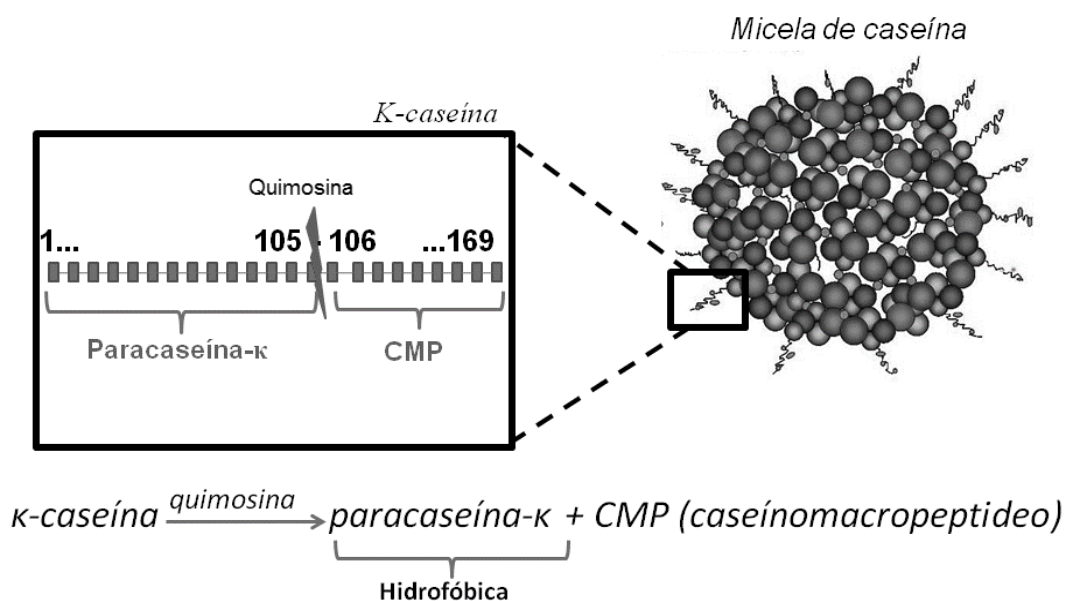


FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA K-CASEÍNA EM PARACASEÍNA-K E CASEINOMACROPEPTIDEO.  
 FONTE: ADAPTADO DE ORTEGA-REQUENA e REBOUILLAT (2015).

Quando cerca de 90% de toda a  $\kappa$ -caseína é hidrolisada (fase 1), inicia-se a segunda fase da coagulação, pois a capacidade estabilizadora da  $\kappa$ -caseína é perdida. Na segunda fase, as frações de caseína altamente fosforiladas se combinam ao cálcio livre, e assim formar um coágulo que engloba os demais constituintes do leite (SCOTT *et al.*, 2002).

O processo de agregação das micelas de caseína ainda não está completamente elucidado, contudo as forças atrativas envolvidas incluem pontes com o cálcio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (LUCEY, 2011).

As condições nas quais se dá a coagulação enzimática, seja de temperatura, composição ou pH, estão diretamente relacionadas à estrutura final do gel lácteo.

### 3.4 ESTUDOS ESTRUTURAIS NOS MODELOS LÁCTEOS

#### 3.4.1 Importância das propriedades mecânicas em alimentos

A textura de um alimento é classificada com uma propriedade sensorial complexa, onde muitos estímulos fisiológicos atuam ao mesmo tempo na percepção do produto. Contudo, a textura tem origem na estrutura ou microestrutura do alimento, em nível molecular ou macroscópico, onde a sensação textural depende de como a

estrutura se deforma durante a mastigação, ou seja, como o material se comporta durante a deformação (CHEN e ROSENTHAL, 2015).

As alterações nas propriedades estruturais dos alimentos são uma das mais importantes formas de alterar suas características sensoriais, funcionais e de conservação, pois afetam a forma como o consumidor percebe e avalia os produtos. Recentes estudos encontraram correlação entre a microestrutura e a percepção de sal, açúcar e aromas nos alimentos (TOURNIER *et al.*, 2009; PANOUILLÉ *et al.*, 2011; MOSCA *et al.*, 2015B).

Nos produtos lácteos, a microestrutura é afetada principalmente pela forma como as caseínas estão organizadas na rede proteica e pelas condições de processamento utilizado, pois o gel proteico é formado quando forças repulsivas e atrativas são balanceadas, fenômeno que está sujeito aos efeitos do pH, temperatura e força iônica (HORNE e BANKS, 2004; RITZOULIS e KARAYANNAKIDIS, 2015; SILVA *et al.*, 2015b).

Aditivos podem ser adicionados a alimentos para modificar suas propriedades conforme a demanda tecnológica (CAROCHO, MORALES e FERREIRA, 2015), como os acidificantes, que são capazes de alterar a conformação da rede de caseína, principalmente pela solubilização do fosfato de cálcio coloidal (CCP) que faz parte das ligações entre as proteínas e, assim, modificar a estrutura dos derivados lácteos (ERCILI-CURA, HUPPERTZ e KELLY, 2015).

Estudos sobre a estrutura dos alimentos são frequentemente realizados utilizando análises reológicas ou das suas propriedades mecânicas aliadas com análises da microestrutura por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análises do perfil de textura instrumental (TPA) (FLOURY *et al.*, 2009; ORREGO, TRONCOSO e ZÚÑIGA, 2015; PANG *et al.*, 2015; TAHMASEBI *et al.*, 2016).

#### *3.4.1.1 Considerações sobre a Análise de Perfil de textura instrumental (TPA)*

A Análise do Perfil de Textura (TPA) consiste na medição das propriedades mecânicas de alimentos em um ensaio de dupla compressão axial para a construção de uma curva força vs. tempo, como a demonstrada na FIGURA 11, com a qual podem ser calculados os parâmetros de dureza, fraturabilidade, adesividade, coesividade, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade e resiliência dos produtos (PONS e FISZMAN, 1996; BOURNE, 2002).

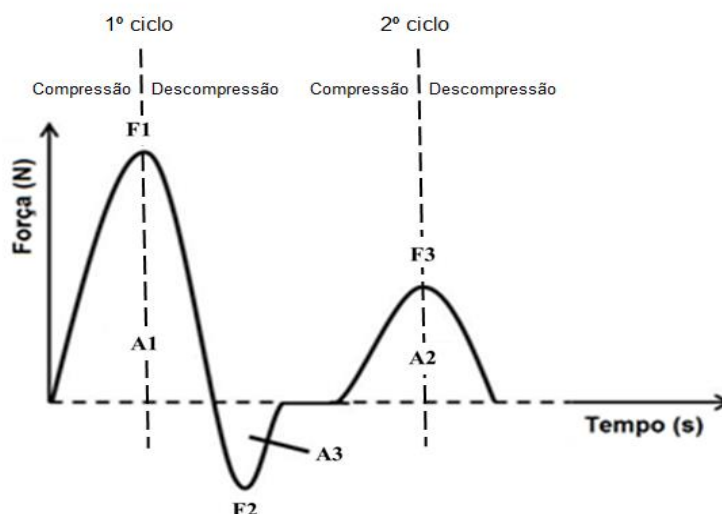


FIGURA 11. CURVA FORÇA-TEMPO DA ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA), ONDE A = ÁREA SOB A CURVA; F = FORÇA.  
 FONTE: ADAPTADO DE SIEFARTH *et al.* (2014).

O princípio desta técnica é simular a ação de uma mordida por meio da compressão da amostra entre duas placas planas, assim como fazem os dentes. Por isso, as compressões devem, preferencialmente, ser acima de 70% da altura da amostra, e idealmente em torno de 90% (BOURNE, 2002). Contudo, o teste pode ser adaptado ao tipo de amostra e às respostas que se espera com compressões entre 20-50%, quando ainda é possível obter informações sobre a dureza, elasticidade, coesividade e gomosidade e mastigabilidade das amostras (PONS e FISZMAN, 1996).

Em uma compressão uniaxial, apenas um dos lados do material recebe a tensão, enquanto que nas outras direções, onde não há tensão externa, há o ajuste das tensões internas do material (VAN VLIET, 2013). Desta forma, as respostas obtidas na análise de TPA estão relacionadas às tensões internas, que dependem da estrutura dos alimentos.

Bourne (2002) define os parâmetros da análise de perfil de textura como:

- Dureza: força máxima exigida para uma deformação, relacionada com a firmeza dos alimentos. É expressada pelo valor máximo de força no primeiro ciclo de compressão (F1) (FIGURA 11).

- Fraturabilidade: Mede a facilidade do alimento em se romper com o aumento da carga. Expresso pela força da quebra significativa da amostra na primeira compressão.

- Coesividade: Razão entre as áreas A1 e A2 da FIGURA 11. Está relacionado com a resistência à tração e à força das ligações internas da proteína. Representa a taxa com a qual o alimento se desintegra sob ação mecânica.

- Adesividade: Representa o trabalho necessário para ultrapassar as forças atrativas entre a superfície e o alimento, ou seja, é o trabalho necessário para separar o êmbolo da amostra durante o retorno da primeira compressão. É representada pela área negativa de força A3 na FIGURA 11.

- Elasticidade: Fração da altura que a amostra recupera entre o final da primeira compressão e o início da segunda, ou seja, quando a força é removida.

- Gomosidade: Produto entre dureza x coesividade, expressando a relação entre estes dois parâmetros nas características de desintegração do alimento. Representa uma característica de alimentos semi-sólidos.

- Mastigabilidade: Produto da gomosidade x elasticidade. Usado para alimentos sólidos. Está relacionada às características de maciez e resistência do alimento.

- Resiliência: Razão entre área de descompressão do primeiro ciclo e a área de compressão de A1. Representa como a amostra se recupera da deformação, em termos de velocidade e forças derivadas.

Dependendo das características da amostra, devem ser selecionados os parâmetros da análise de TPA que melhor explicam seu comportamento mecânico ao reportar os resultados. Gomosidade e elasticidade nunca podem ser expressos para o mesmo alimento, pois são características de materiais diferentes, respectivamente, de semi-sólidos e sólidos. A fraturabilidade pode não está presente em todos os alimentos. Desta forma, a análise dos resultados deve ser cuidadosa em relação à amostra (PONS e FISZMAN, 1996).

### 3.5 LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS DE SABOR EM MODELOS LÁCTEOS.

Sobre as possíveis atribuições do ácido lactobiônico como melhorador de sabor em alimentos quatro hipóteses podem ser propostas como possíveis mecanismos de ação, entre elas, que a modificação da percepção aconteça pela alteração na textura; que haja interação com compostos de sabor; ou com compostos de aroma; ou ainda que possa interagir com receptores fisiológicos (MCCUTCHEON, 1992; BUSCH, YONG e GOH, 2013; CHABANET *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2015; SYARIFUDDIN *et al.*, 2016).

Enquanto testes sensoriais em humanos utilizando ácido lactobiônico ainda não são totalmente regulamentados no Brasil ou na Europa, ensaios *in vitro* relacionando as modificações estruturais com a liberação e mobilidade de sódio e com a liberação de aromas podem iniciar o entendimento sobre a relação do ácido lactobiônico com as matrizes alimentícias, e assim auxiliar futuros estudos sensoriais.

#### 3.5.1 Liberação de sal

O consumo excessivo de sal pela população é uma crescente preocupação mundial, pois estudos apontam que grandes quantidades de sal na dieta levam a casos de hipertensão e a doenças cardiovasculares (WHELTON, 2014). Contudo, a redução de sal em alimentos ainda é um desafio para a indústria, visto que o sal, além de conferir as características de sabor do produto, está relacionado também à textura, às atividades enzimáticas e à segurança microbiológica, fatores que determinam a qualidade do alimento (ZANDSTRA, LION e NEWSON, 2016). Além disso, em queijos pode induzir alterações físicas nas proteínas, influenciando sua solubilidade e conformação, por meio da modificação da hidratação das proteínas, o que resulta em mudanças na textura destes alimentos (GUINEE e FOX, 2004).

Os estudos sobre como o sódio interage com os alimentos podem ajudar na criação de novas técnicas de produção onde seja possível reduzir o teor de sódio com o mínimo de prejuízos à qualidade dos produtos possível (ZANDSTRA, LION e NEWSON, 2016).

Alterações na viscosidade e da dureza podem impactar significativamente na percepção do sabor por modificar a liberação de sal nos alimentos. No trabalho de (COSTELL, PEYROLON e DURAN, 2000), géis produzidos com gomas gelana e carragena quando menos firmes foram percebidos como mais salgados do que os

mais duros. Foram encontrados resultados similares em estudos conduzidos com géis lácteos, onde o aumento da viscosidade também diminuiu a percepção do sabor, mesmo que não tenha sido encontrado significativa diferença nos testes de liberação (TOURNIER *et al.*, 2009).

Interações entre percepção e textura foram também reportados em modelos lácteos mais complexos, imitando um queijo semi-duro com diferentes composições de proteína e gordura, onde nas amostras mais duras, analisadas tanto do ponto de vista mecânico quanto sensorial, apresentaram menor intensidade na percepção do gosto salgado (LAWRENCE *et al.*, 2012a). Além disso, no estudo de Boisard *et al.* (2014), mudanças na composição do modelo de queijo induziram alterações na microestrutura das amostras e assim, na mobilidade dos íons sódio. Consequentemente, a percepção de salinidade foi também alterada.

### 3.5.2 Análise molecular de mobilidade de sódio em RMN $^{23}\text{Na}$

Na técnica de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), as amostras são submetidas a um campo magnético, onde seus núcleos são excitados a um estado energético mais elevado e então o sinal emitido quando os átomos retornam a seu estado mais estável são registrados. O sinal emitido (intensidade em função do tempo) é então transformado matematicamente pela transformação de Fourier. Dois tempos de relaxação caracterizam o retorno ao equilíbrio dos núcleos: o tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e o tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ). Estes tempos são característicos da mobilidade dos núcleos estudados, porque eles determinam o tempo necessário para o retorno ao equilíbrio depois da excitação (MOREAU e GUICHARD, 2006).

Os núcleos mais estudados nos produtos lácteos são os núcleos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{31}\text{P}$  (BELLOQUE e RAMOS, 1999). Porém, com o aumento da preocupação com a redução de sódio em alimentos, a técnica de RMN passou a ser utilizada também para o estudo de quantificação dos íons de sódio em produtos alimentícios, pois esta é uma técnica não invasiva que permite inclusive o estudo do estado de ligação dos íons (BOISARD *et al.*, 2014).

Os núcleos de sódio possuem um caráter quadrupolar (spin  $I = 3/2$ ), que podem interagir com o campo elétrico (interações quadrupolares). Seus estados de spin iniciais ( $+3/2$ ,  $+1/2$ ,  $-1/2$ ,  $-3/2$ ) são modificados e passam a ser caracterizados por

energias diferentes. É possível distinguir a transição central ou interna ( $-1/2, +1/2$ ) e as transições externas ou satélites ( $+1/2, +3/2$ ) e ( $-1/2, -3/2$ ). A transição interna contribui para 40% da área do sinal da RMN e as duas transições externas por 60% (30% cada uma). Devido as interações quadripolares, as transições externas relaxam mais rápido que a transição interna (GOBET *et al.*, 2010).

Em alimentos, esta técnica já foi utilizada para estudo do sódio em géis de pectina (BROSIO *et al.*, 1993) ou carragena (GOBET *et al.*, 2009), carne de porco salgada (RUIZ-CABRERA *et al.*, 2004), salmão defumado (MOUADDAB *et al.*, 2007), queijos (GOBET *et al.*, 2010) e pães (GUJONSDOTTIR, TRAORE e RENOU, 2013).

No estudo de (GOBET *et al.*, 2010), foi validada a utilização da técnica de RMN em *single quantum* (SQ) para quantificação dos íons sódio. A fração de sódio ligado, com movimento restrito, pode ser medida nas experiências em *double quantum* (DQ). Desta forma, a técnica de RMN permite estudar as interações entre o sódio e os constituintes dos alimentos a nível molecular.

### 3.5.3 Liberação de aromas

Apesar de representar uma pequena parte da composição dos alimentos (0,05 a 1%), os compostos orgânicos voláteis (VOC = *volatile organic compounds*) são de fundamental importância nas suas características, pois estes compostos são pequenas moléculas voláteis capazes de estimular sensações olfativas e despertar o interesse do consumidor pelo produto. No alimento, os compostos de aroma estão distribuídos entre a fase aquosa e a fase lipídica em função de sua hidrofobicidade ( $\log P$ ). Além disso, a sua volatilidade depende da sua natureza química e sua massa molar (GUICHARD, 2006).

Proteínas são capazes fixar compostos aromáticos nos alimentos. Tais interações são geralmente reversíveis, através de ligações hidrofóbicas e de hidrogênio (GUICHARD, 2006), e, geralmente, estão relacionadas ao grau de umidade nos produtos, sendo que em pós protéicos as interações com aromas são devido principalmente às interações eletrostáticas, de van der Waals e pontes de hidrogênio, ou ainda por capilaridade.

Em alimentos com alto teor de umidade, os aromas se ligam nos sítios hidrofóbicos das proteínas, na maior parte dos casos (FENNEMA, DAMODARAN e PARKIN, 2010). Essas ligações dependem da natureza do composto de aroma e da



estrutura da proteína em questão (LUBBERS, 2006), que por sua vez depende do meio em que ela está inserida, tendo sua conformação modificada por pH ou temperatura, por exemplo (GUICHARD, 2006).

Na liberação de aromas de uma matriz alimentícia, a taxa de transferência de massa (difusão e convecção) é influenciada pela força motriz, a qual é diferente entre as fases líquidas e gasosas, e pela resistência de fluxo da amostra, o que reflete na cinética de liberação. Na fração aquosa, a força motriz é o gradiente de concentração dos VOC, já no caso de gases ou de uma fase vapor, a força motriz é a diferença de pressão parcial ou da diferença de pressão de vapor. Nos dois casos, se refere a uma diferença de potencial químico. A resistência provém, tanto em meio líquido como em fase gasosa, das interações entre os materiais e o meio (LUBBERS, 2006).

As interações de proteínas com aromas mais estudadas utilizaram a  $\beta$ -lactoglobulina como referência (ANDRIOT *et al.*, 2000; VAN RUTH e VILLENEUVE, 2002; TAVEL *et al.*, 2008), porém há estudos com outras proteínas como a albumina do soro bovino (BSA), actomiosina e proteínas da soja (BOELRIJK *et al.*, 2006; TROMELIN, ANDRIOT e GUICHARD, 2006; VOILLEY e SOUCHON, 2006). No estudo de (GUICHARD e LANGOURIEUX, 2000), os pesquisadores concluíram que a  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) diminuiu a volatilidade e consequente percepção sensorial de compostos de aroma com características hidrofóbicas, devido às interações proteína-aroma, evidenciando a importância do conhecimento da forma de interação das proteínas na produção de alimentos e apreciação pelo consumidor.

Devido às interações citadas, o estudo da liberação de aromas também vem sendo um importante aliado às estratégias de redução de sal e gordura em alimentos. O trabalho de Lawrence *et al.* (2011) demonstrou que aromas de sardinha e queijo podem aumentar a sensação de gosto salgado em modelos de queijo. Além disso, diversos estudos relataram a influência da textura na liberação de aroma e, consequentemente, na percepção do sabor de alimentos. Gierczynski *et al.* (2008) encontraram que o aumento na dureza foi relacionado com o aumento na liberação de aromas em amostras de modelos lácteos. Tournier *et al.* (2009) também encontraram uma possível interação *cross-modal* entre percepção de sabor e textura. Desta forma, os estudos sobre mecanismos para melhorar a liberação de aromas e, consequentemente, a aceitação sensorial de alimentos vem se tornando cada vez mais significativo.

### 3.6 ESTABILIDADE DOS MODELOS LÁCTEOS

Muitas técnicas de conservação de alimentos, como a secagem, o congelamento e o uso de aditivos, se baseiam na retirada ou na imobilização do conteúdo de água, visando aumentar a vida de prateleira dos produtos, pois alimentos com mais alta umidade estão mais propensos ao crescimento de microrganismos e reações químicas (REID e FENNEMA, 2009).

As técnicas de conservação podem afetar os processos de difusão em uma matriz láctea, podendo influenciar a percepção sensorial do alimento pela forma como os compostos do sabor se difundem. As modificações das características físicas das amostras ocorrem principalmente em função do tamanho dos poros da matriz, da viscosidade da fase aquosa que comporta os solutos, como ácidos e sais, da estrutura formada pelas proteínas, da quantidade de água ligada às proteínas que aumenta o seu diâmetro efetivo e da quantidade de matéria seca dos alimentos (WALSTRA e VAN VLIET, 2009).

O conhecimento do teor de umidade dos alimentos não é suficiente para determinar sua estabilidade, visto que produtos com a mesma quantidade de água em suas composições podem ter diferentes perecibilidades (REID e FENNEMA, 2009). Este fenômeno é explicado pela diferença nas concentrações de solutos que interagem com a água do alimento, diminuindo, assim, a pressão de vapor relativa (PVR), pois o solvente tem mais dificuldade em passar para a fase vapor, e, desta forma, a pressão de vapor do alimento será sempre menor que da água pura. Esta é uma propriedade intrínseca de cada alimento, dependente da sua composição, chamada de atividade de água ( $a_w$ ) (FELLOWS, 2006).

A atividade de água, que pode ser calculada pela EQUAÇÃO 1, é uma das formas mais seguras de predição da estabilidade dos sistemas alimentícios com água como componente majoritário, pois está estreitamente relacionada com reações químicas e com o crescimento microbiano (REID e FENNEMA, 2009).

$$a_w = \frac{PVR}{PVR_0} \quad (1)$$

Onde PVR é a pressão relativa de vapor do alimento e  $PVR_0$ , a pressão de vapor da água pura a mesma temperatura.

Atualmente, novas técnicas para o estudo da estabilidade de alimentos estão disponíveis, como a técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC), que vem se destacando como uma importante ferramenta pela rapidez em obter os resultados, reprodutibilidade e necessidade de pequenas quantidades de amostras.

Por meio da análise de DSC podem ser obtidas informações sobre o comportamento das amostras quando congeladas, quantificar a fração mássica de gelo e a porção de água não-congelável (YOSHIDA, HATAKEYAMA e HATAKEYAMA, 1992; LE DEAN *et al.*, 2001; MATUDA *et al.*, 2005; HATAKEYAMA *et al.*, 2012); obter informações sobre a temperatura de transição vítrea dos alimentos (ROOS, 2003; MATUDA *et al.*, 2008) ou ainda identificar temperaturas de desnaturação proteica, desidratação, oxidação e decomposição (MURRAY, ARNTFIELD e ISMOND, 1985; FITZSIMONS, MULVIHILL e MORRIS, 2007; HAUG *et al.*, 2009; KONG *et al.*, 2016; QI *et al.*, 2016). Isto é possível devido à miscibilidade em água dos carboidratos e proteínas em sistemas alimentícios, que possibilita a identificação de transições de fase de primeira ordem, como fusão e cristalização, e transições de estado, como desnaturação, gelatinização, transição vítrea (ROOS, 2003).

Em modelos lácteos, os métodos mais utilizados para o estudo da estabilidade envolvem a capacidade de retenção de água (CRA), que pode indicar a força dos géis formados (MELETHARAYIL, PATEL e HUPPERTZ 2015). Por outro lado, não há trabalhos com esta finalidade para géis lácteos utilizando DSC. A técnica calorimétrica pode auxiliar na compreensão de fenômenos complementares à técnica de CRA no estudo de estabilidade dos modelos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Os géis lácteos foram preparados utilizando concentrado proteico de leite em pó ultrafiltrado PL 75P (Triballat, França) composto por 74,5% (m/m) de proteínas, 11% (m/m) de lactose, 8% (m/m) de cinzas e 1,5% (m/m) lipídios. Água ultrapura tipo 1 (Milli-Q®, Millipore, EUA), cloreto de sódio (Sigma Aldrich, EUA) e coalho com mistura de quimosina e pepsina (relação  $\geq 1,38$ ) Berthelot®530 (Laboratoires Abia, França). Como acidificantes foram usados ácido lactobiônico (LBA) (Reliable Biopharmaceutical, EUA) ou glucono- $\delta$ -lactona (GDL) (Sigma Aldrich, EUA).

Para a aromatização dos géis lácteos foram utilizados oito compostos orgânicos voláteis com pureza > 95%: butanoato de etila, hexanoato de etila, diacetil, 2-heptanona, 3-octanona, 2-nonanona, 3-metil butanal e octanal, todos adquiridos da Sigma Aldrich, EUA.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Ensaios Preliminares

Formulações para os géis lácteos foram testadas a fim de se obter um gel lácteo estável com características próximas a um queijo classificado como de muito alta umidade (> 55% umidade) e desnatado (< 10% gordura) (BRASIL, 1996) que pudesse ser acidificado com ácido lactobiônico ou com glucono- $\delta$ -lactona.

Para isso foram testadas formulações com concentrações com 12 e 20% de concentrado proteico de leite (CPL), assim como as concentrações de LBA e GDL necessárias para atingir os valores de pH 6,2 ou 5,5, valores escolhidos por serem frequentemente encontrados em produtos lácteos.

#### 4.2.2 Preparação dos géis lácteos

A partir dos testes preliminares foram desenvolvidos cinco géis lácteos salgados. Entre eles, uma amostra controle sem acidificação, duas matrizes usando ácido lactobiônico (LBA) como acidificante com pH 6,2 (HLBA) ou pH 5,5 (LLBA) e

duas matrizes utilizando glucono- $\delta$ -lactona (GDL), também em dois valores de pH: 6,2 (HGDL) e 5,5 (LGDL).

Pelos testes preliminares foi verificado que para conseguir o mesmo pH, diferentes quantidades de GDL e LBA deveriam ser utilizados. Desta forma, a composição das matrizes lácteas ajustada para valores de pH 6,2 e 5,5, acidificadas com glucono- $\delta$ -lactona ou ácido lactobiônico, é apresentada na TABELA 1.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DAS MATRIZES LÁCTEAS.

Composição (g.100g <sup>-1</sup> )	Controle	HGDL	HLBA	LGDL	LLBA
Concentrado protéico de leite	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
NaCl	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Água deionizada	79,00	78,75	78,50	77,63	76,33
Ácido lactobiônico (LBA)	0	-	0,5	-	2,7
Glucono- $\delta$ -lactona (GDL)	0	0,25	-	1,4	-
Coalho ( $\mu$ l)	500	500	500	500	500

Nota: HLBA: amostra com pH 6,2 com LBA; HGDL: pH 6,2 com GDL; LGDL: pH 5,5 com GDL; LLBA: pH 5,5 com LBA.

Os géis lácteos foram preparados conforme adaptação do método desenvolvido por Mosca *et al.* (2015a). Para a produção de 100 gramas de gel lácteo, a água deionizada (Milli-Q®) aquecida a 50°C foi adicionada ao concentrado proteico de leite em pó, e então a mistura foi homogeneizada e agitada durante 30 minutos em banho-maria a 50 °C para a hidratação das proteínas.

Após 30 minutos a mistura líquida foi removida do banho e recebeu 1% de sal (cloreto de sódio), sendo homogeneizada por três minutos em agitador magnético. Então, a mistura foi adicionada de acidificante (LBA ou GDL) e agitado durante 1 minuto e, em seguida, foi homogeneizado em dispersor Ultra-Turrax® T25 (velocidade =  $3,3 \pm 0,1$  (x1000) rpm) (IKA), por 30 segundos.

Para a coagulação, 500  $\mu$ l de coalho diluído (10% m/m) foram adicionados à mistura, que foi então homogeneizada durante 1 min 30 s. Em seguida, as amostras líquidas foram levadas à estufa a 32 °C por 40 minutos em frascos fechados com Parafilm® para evitar a evaporação da água. Ao final dos 40 minutos na estufa, as amostras encontram-se coaguladas.

A amostra controle foi produzida seguindo o mesmo protocolo, sem a adição de qualquer agente acidificante. O pH das amostras foi medido no final do período na estufa e em cerca de 15 horas após a produção para verificar estabilidade destes valores.

O esquema demonstrado na FIGURA 12 resume as etapas de produção das amostras utilizadas nos ensaios.

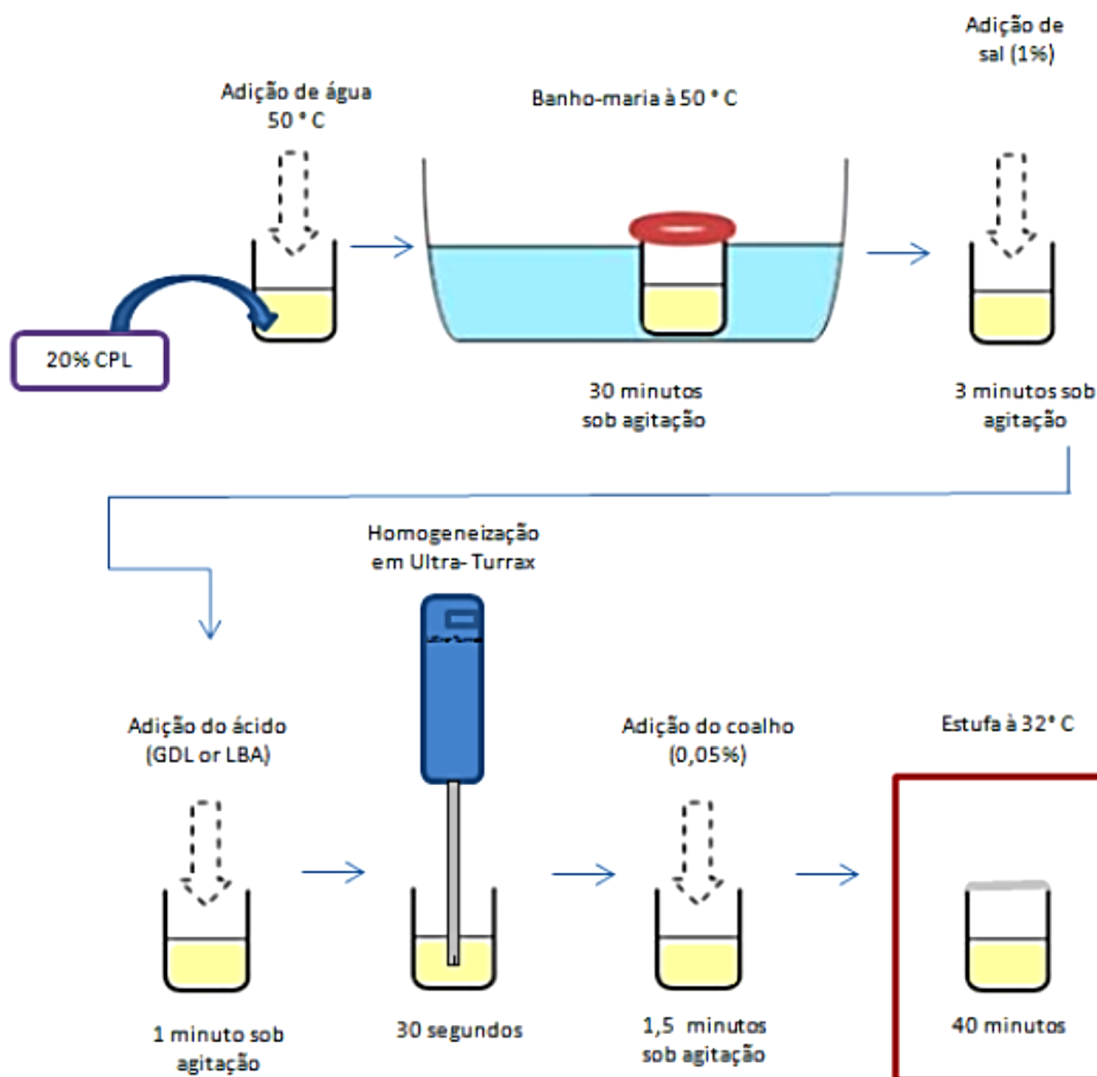


FIGURA 12. MÉTODO EMPREGADO PARA A PRODUÇÃO DOS GÉIS LÁCTEOS.

#### 4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microestrutura das matrizes lácteas foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), segundo o método descrito por Pang *et al.* (2014).

A preparação das amostras seguiu os passos de fixação, desidratação etanólica e desidratação por ponto crítico, para retirar toda a umidade das amostras. Para isso, as amostras foram cortadas em cubos de 1 mm<sup>3</sup> e imediatamente imersas em tampão fosfato 0,1M (pH 6,8) com 2,5% (v/v) de glutaraldeído para fixação, onde permaneceram por três horas. Após este processo, as amostras foram lavadas por duas vezes no tampão fosfato por dez minutos cada.

Então, foi iniciada a série de desidratação etanólica em soluções aquosas de 50, 70, 90 e 100% (v/v) de etanol, onde as amostras permaneceram 10 min em cada solução, sendo repetida três vezes na solução 100%. Para completar a desidratação das matrizes lácteas foi utilizada a técnica de secagem por ponto crítico do CO<sub>2</sub>, utilizando um secador Balzers CPD030 (Electron Microscopy Sciences, EUA). Depois de secas, as amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio e metalizadas com uma fina camada de ouro (metalizador Balzers SCD030) para possibilitar a visualização no microscópio.

As análises da microestrutura dos géis foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura de alta resolução FEI Quanta 450 FEG, no Centro de Microscopia Eletrônica – UFPR, com aumento de 25000 vezes, em baixo vácuo (30 Pa) e aceleração de voltagem de 10 kV.

#### 4.2.4 Capacidade de Retenção de Água (CRA) dos géis lácteos.

Para a avaliação da capacidade de retenção de água (CRA) nas matrizes lácteas, as amostras foram preparadas conforme descrito na seção 4.2.2. Contudo, antes da etapa de coagulação, aproximadamente 20 g da amostra líquida foram vertidos em tubos de centrífuga de 50 mL e então foram tampados e levados à estufa para coagulação por 40 min. Após a coagulação, as amostras foram mantidas à temperatura de refrigeração (~ 4 °C) durante uma noite e analisadas no dia seguinte.

Os tubos contendo as amostras foram centrifugados em ultra-centrífuga refrigerada Himac CR21GII (HITACHI), a 4750 rpm (3000x g) durante 15 min a 4 °C, seguindo adaptação do protocolo descrito por Meletharayil, Patel e Huppertz (2015).

O soro sobrenadante dos tubos, resultante da etapa de centrifugação, foi pesado em balança analítica e, então, a CRA foi calculada em porcentagem (m/m) da massa do sólido restante nos tubos em relação a massa total da amostra, conforme a EQUAÇÃO 2.

$$CRA (\%) = 100 \cdot \frac{massa_{amostra} - massa_{soro}}{massa_{amostra}} \quad (2)$$

#### 4.2.5 Análise de atividade de água ( $a_w$ )

As amostras ainda líquidas foram colocadas nas cápsulas próprias do higrômetro Aqualab 3TE em camadas de cerca de 3 mm de espessura. As cápsulas foram tampadas e então seladas com Parafilm® para evitar a desidratação e foram levadas à estufa a 40 °C para a coagulação dos géis, assim como foi descrito nos métodos anteriores. A atividade de água foi obtida por leitura diretamente no higrômetro, após equilíbrio da temperatura em 25 °C.

#### 4.2.6 Análise do perfil de textura

Os parâmetros de dureza, adesividade e coesividade dos géis lácteos foram obtidos utilizando o texturômetro TA-XT2 plus, com célula de carga de 25 kg (Stable Microsystems Ltda.) em um ensaio de perfil de textura (TPA) com compressão axial dupla a 30% da altura inicial das amostras, utilizando um probe de compressão de 100 mm de diâmetro (P/100) e velocidade de ensaio de 0,8 mm.s<sup>-1</sup>, no qual dureza expressa a força máxima exigida para uma deformação determinada durante o primeiro ciclo de compressão, adesividade é o trabalho necessário para separar a amostra do equipamento que a compacta, expressando as forças de atração das amostras e coesividade é a medida da força das ligações internas das proteínas (BERTOLINO *et al.*, 2011).

As amostras foram dimensionadas em formato cilíndrico com 30 mm de diâmetro por 30 mm de altura e foram analisadas a 20 °C ± 1 °C. Seis repetições da análise para cada gel lácteo foram realizadas a partir de dois lotes diferentes (3 replicatas de cada lote). Os dados foram tratados pelo software Exponent (Stable Microsystems).

#### 4.2.7 Calorimetria exploratória diferencial dos géis lácteos

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi usada para obter o perfil térmico das amostras de forma a avaliar a estabilidade térmica dos géis lácteos. O ensaio foi realizado em um calorímetro modelo Q-200 (T.A. Instruments Ltd.), previamente calibrado com Índio 99,99 % de pureza ( $p.f.$  = 156,6 °C;  $\Delta H$  = 28,56 J g<sup>-1</sup>), utilizando método adaptado de Leone *et al.* (2014) e Yoshida, Hatakeyama e Hatakeyama *et al.* (1992).



Para a análise foram usados cadinhos de alumínio selados e com tampa microperfurada, onde foram pesados aproximadamente 10 mg de amostra para cada análise.

As curvas foram realizadas e calculadas pelo software *Universal analysis 2000* (T.A. Instruments Ltd.), sob fluxo de ar sintético de 50 mL.min<sup>-1</sup>, em ciclo de resfriamento e aquecimento, com início em 20 °C e resfriamento até -60 °C. Foi aguardado 5 minutos para estabilização da amostra a -60 °C e então o sistema foi aquecido até 300 °C, a uma taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup>.

As análises do DSC foram acompanhadas por termomicroscopia, onde as imagens foram obtidas por um microscópio digital acoplado à célula do DSC. O microscópio é equipado com sensor de cor CMOS e lentes de vidro com 2 megapixel de resolução e aumento de 800 vezes. O software AMCAP V9.016 foi utilizado para a captura da imagem das amostras (COLMAN *et al.*, 2016).

#### 4.2.8 Mobilidade e liberação de sal nas matrizes lácteas.

##### 4.2.8.1 Análise de mobilidade iônica de sódio por RMN <sup>23</sup>Na.

Para analisar a mobilidade dos íons de sódio nas matrizes lácteas foi utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear de sódio (RMN <sup>23</sup>Na), em sinal *single quantum* (SQ) para quantificar a concentração total de sódio e a fração de sódio ligado à matriz proteica nos géis lácteos, e em sinal *double quantum filtered* (DQF) para obter informações sobre a mobilidade de sódio "ligado" aos géis lácteos. O procedimento e os cálculos deste ensaio foram realizados segundo protocolo descrito por Mouaddab *et al.* (2007).

Os dois tempos de relaxação transversal, rápido e lento, são obtidos por meio da gravação de uma série de experiências em DQF em diferentes tempos de criação, ajustados em função da Equação 3, associada à altura dos picos do sinal DQF:

$$k \times [\exp(\tau/T_{2S}) - \exp(\tau/T_{2F})] \quad (3)$$

As amostras foram preparadas como o protocolo descrito na seção 4.2.2, onde, após a adição do coalho, cerca de 2 ml do modelo ainda líquido foi pipetado em um tubo de RMN de 10 mm. Em seguida, um tubo de RMN de 5 mm, preenchido com uma solução externa de referência, Na<sub>7</sub>Dy(PPP)<sub>2</sub> em D<sub>2</sub>O ([Na<sup>+</sup>] = 0,40 M), foi

introduzido no centro do tubo de amostra, conforme ilustrado na FIGURA 13. Em seguida, o sistema foi selado com Parafilm® para evitar a desidratação e colocado no forno para a coagulação por 40 minutos.

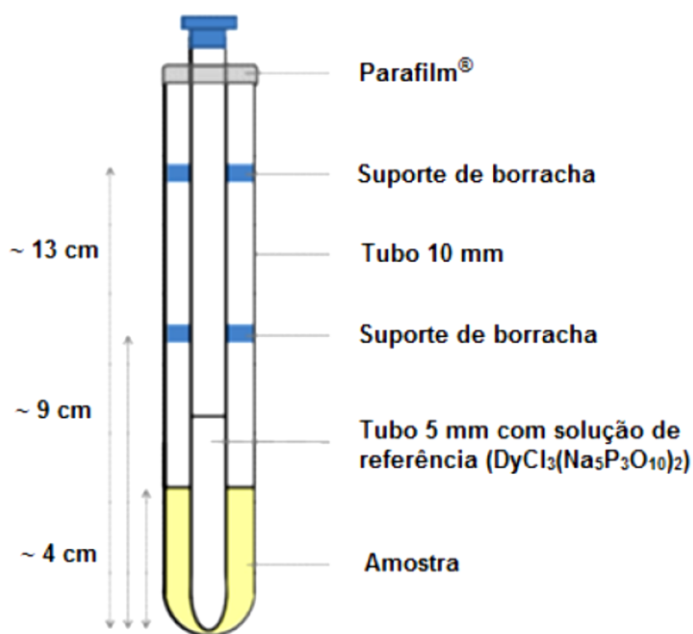


FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO DA PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E REFERÊNCIA UTILIZADOS NA ANÁLISE MOBILIDADE DE ÍONS SÓDIO EM RMN  $^{23}\text{Na}$ .

As análises em RMN  $^{23}\text{Na}$  foram realizadas a 25 °C em espectrômetro Bruker Avance III 500 MHz, equipado com uma sonda de 10 mm e os dados foram registrados a 132,29 MHz.

Neste estudo molecular, a mobilidade dos íons de sódio é dada pela caracterização do tempo requerido para o retorno do núcleo de sódio ao equilíbrio depois da excitação, que é obtido através da quantificação transversal ( $T_2$ ) dos tempos de relaxação da amostra.

Devido à característica quadrupolar do núcleo de sódio, o tempo de relaxação transversal é dividido em transições internas e externas, que têm diferentes energias. Sendo assim, o tempo de relaxação transversal é expresso como  $T_{2s}$ ,  $T_{2f}$ , para a transição interna "lenta" e a transição externa "rápida", respectivamente, onde um maior tempo de relaxação sugere maior mobilidade dos íons de sódio.

O momento de maior intensidade do tempo de relaxação  $T_2$  representa o tempo de criação otimizado  $\tau^{opt}$ , obtido pela Equação 4, que caracteriza a

organização do sistema (estrutura) em torno dos íons de sódio, onde um sinal mais baixo representa um sistema mais organizado.

$$\tau^{opt} = \frac{\ln(R_{2F}/R_{2S})}{R_{2F}-R_{2S}} \quad (4)$$

Onde R representa a taxa de relaxação spin-spin para as frações rápida ( $R_{2F}$ ) e lenta ( $R_{2S}$ ).

Por comparação das integrais das áreas dos sinais de DQF e SQ (razão  $A_{DQ}/A_{SQ}$ ) é possível quantificar a fração de sódio "ligado" (GOBET *et al.*, 2009; BOISARD *et al.*, 2013).

#### 4.2.8.2 Liberação de sal *in vitro*.

Dez mililitros de gel lácteo antes da coagulação foram vertidos em uma membrana de diálise SpectraPor® MWCO:3500 Da (Spectrum Laboratories Inc., EUA) e, em seguida, colocados no forno para a coagulação. As amostras apresentavam aproximadamente 10 cm de comprimento e 10 g em massa.

Após a coagulação, as amostras foram colocadas em um béquer com vinte vezes o seu peso em água e agitou-se o sistema por 90 min, conforme ilustrado na FIGURA 14, utilizando um sensor não-específico para a medição contínua da quantidade de íons que atravessavam a membrana para o ambiente aquoso.

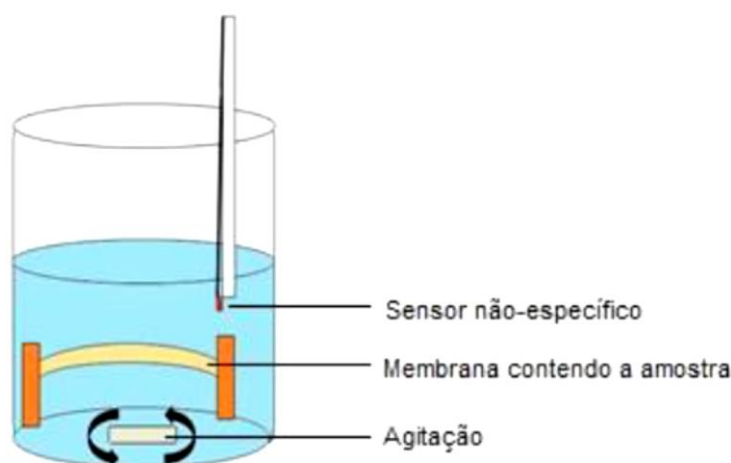


FIGURA 14. ILUSTRAÇÃO DO SISTEMA UTILIZADO NA ANÁLISE DE LIBERAÇÃO DE SAL *IN VITRO*.

FONTE: ADAPTADO DE MOSCA *et al.*, (2014).

O sensor não-específico utilizado, desenvolvido por Emorine *et al.* (2012), pode detectar a condutividade no meio aquoso de forma contínua, e através de uma curva de calibração pode-se calcular diretamente a quantidade de sal liberada em relação ao tempo.

Sendo assim, as concentrações de sal liberadas, em g.L<sup>-1</sup>, foram calculadas pela EQUAÇÃO 5, obtida a partir dos dados da curva de calibração, construída com soluções da NaCl com concentrações de 0,02; 0,05; 0,08; 0,10; 0,20; 0,50; 0,80 e 0,90 g.L<sup>-1</sup>. Na EQUAÇÃO 3, x é o valor de condutividade experimental obtida pelo sensor contínuo.

$$[Sal] = 0,0457x^{-3,322}; \quad R^2 = 0,997 \quad (5)$$

#### 4.2.9 Aromatização dos géis lácteos

Oito compostos voláteis, cujo as características de massa molecular, hidrofobicidade, volatilidade e odor que correspondem são apresentadas na TABELA 2, foram selecionados para compor a mistura de aromas utilizada nas amostras para a análise de liberação de aromas. Foram escolhidos por fazerem parte dos aromas presentes em produtos lácteos, em função da compatibilidade com a técnica de cromatografia gasosa utilizada e considerando a utilização de grupos químicos diferentes.

TABELA 2. CARACTERÍSTICAS DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS ADICIONADOS AS MATRIZES LÁCTEAS PARA AROMATIZAÇÃO.

Composto	Grupo	Massa molecular (g.mol <sup>-1</sup> )	logP	H (Pa.m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )	Odor
Butanoato de etila	Ester	116	1,85	8,237.10 <sup>1</sup>	Maçã, bala, queijo, frutado, morango, doce
Hexanoato de etila	Ester	144	2,83	1,121.10 <sup>2</sup>	Banana, brandy, frutas passas, morango
Diacetil	Cetona	86	-1,34	8,057.10 <sup>-1</sup>	Manteiga, ranço
2-heptanona	Cetona	114	1,98	3,485.10 <sup>1</sup>	Frutado, grama, nozes, sabão
3-octanona	Cetona	128	2,22	3,373.10 <sup>1</sup>	Manteiga, herbáceo, resina
2-nonanona	Cetona	142	2,71	7,192.10 <sup>1</sup>	Fragrante, frutado, grama, leite quente, sabão
3-metil butanal	Aldeído	86	1,23	5,276.10 <sup>1</sup>	Amêndoas, coco, grama fresca, frutado, malte, pungente, suor
Octanal	Aldeído	128	2,78	6,460.10 <sup>1</sup>	Cítrico, gordura, grama, óleo, pungente, sabão, doce

Nota: logP representa a hidrofobicidade do composto de aroma e H (constante de Henry) sua volatilidade.

Fonte: software Episuite 4.1.

Foram escolhidos entre os ésteres o butanoato de etila e o hexanoato de etila. Da classe das cetonas, foram utilizados diacetil, 2-heptanona, 3-octanona e 2-nonanona e da classe dos aldeídos, 3-metil butanal e octanal, para aromatizar as matrizes. A pureza dos compostos foi avaliada por cromatografia em fase gasosa e todos apresentaram pureza acima de 95%.

Para a preparação da mistura, uma quantidade de  $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$  de cada composto de aroma foi dissolvido em propilenoglicol à temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ), sob agitação magnética, durante duas horas. A solução de mistura de aroma foi armazenada a  $4^\circ\text{C}$  até ser aplicada aos géis.

Para a aromatização, as matrizes lácteas foram preparadas como anteriormente descrito na seção 4.2.2, com algumas modificações, que podem ser mais claramente visualizadas na FIGURA 15.

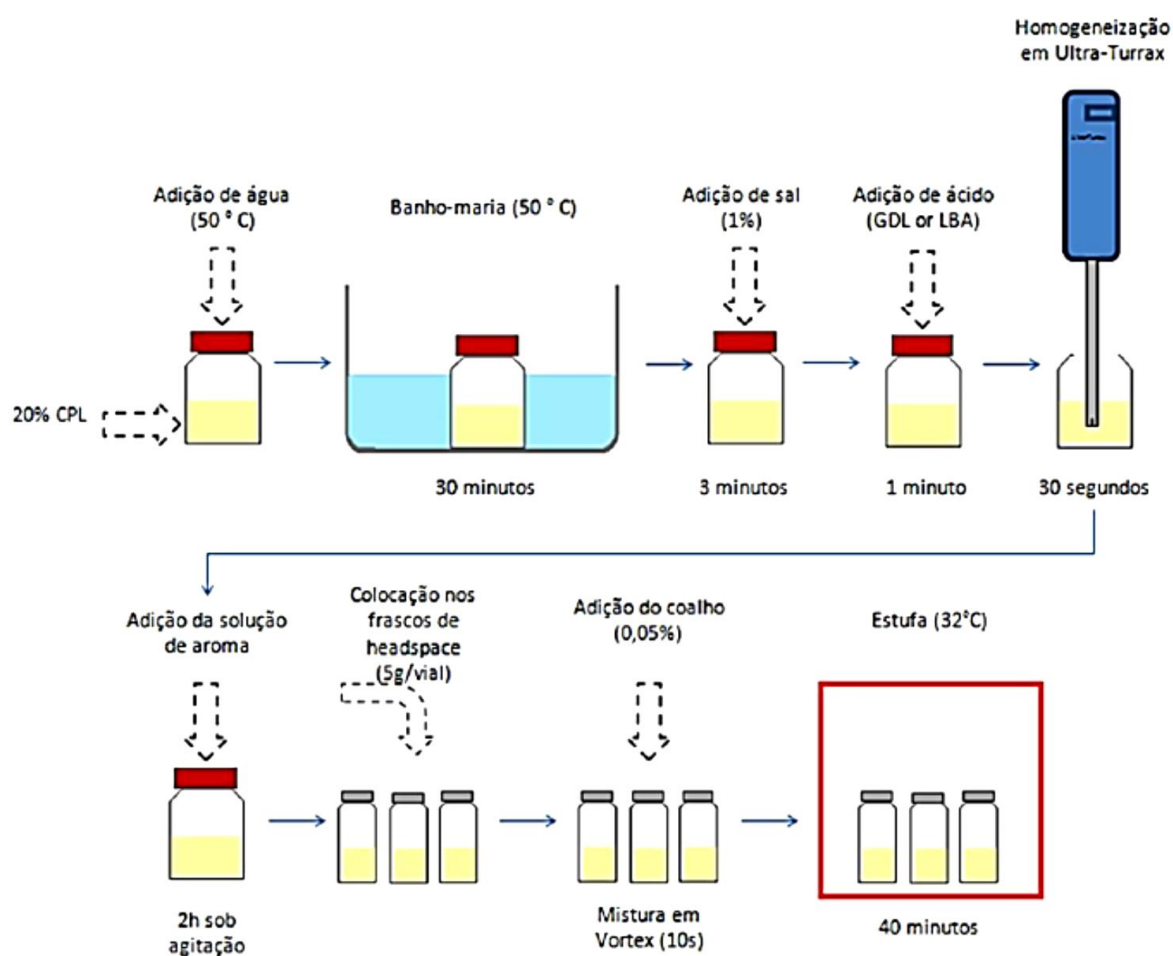


FIGURA 15. ADAPTAÇÕES NO MÉTODO DE PRODUÇÃO DAS MATRIZES LÁCTEAS PARA A ANÁLISE DE LIBERAÇÃO DE AROMAS.

Após a etapa de dispersão em UltraTurrax, 0,2 g.100 g<sup>-1</sup> da solução de aroma previamente preparada foram adicionados à solução de proteínas acidificada e, em seguida, homogeneizado em recipiente hermeticamente fechado durante duas horas, sob agitação magnética.

Após este período, cinco gramas de amostra foram pipetados em frascos para análise de *headspace* de 22,8 mL (Supelco) e o coalho (25 µL em 5 g) foi adicionado. Os frascos de *headspace* foram imediatamente selados com tampas magnéticas (Supelco) com septo traspassável em silicone e, em seguida, foram homogeneizados em vortex e levados à estufa a 32 °C durante 40 minutos para a coagulação. Após este período, os géis lácteos foram analisados por cromatografia em fase gasosa.

#### 4.2.10 Liberação de aroma

Os géis lácteos aromatizados foram analisados por cromatografia em fase gasosa. Cinco repetições foram realizadas para cada formulação de gel lácteo, com apenas uma amostragem em cada frasco de *headspace*.

As amostras preparadas conforme descrição na seção 4.2.9, nos frascos de *headspace*, aguardaram o início das análises em GC-FID em um cooler à temperatura de 10 °C antes da incubação a 32 °C. Antes da injeção, as amostras foram transferidas para o incubador do amostrador automático do equipamento (GERSTEL MPS 2, Gerstel Inc., Mulheim an der Ruhr, Alemanha), onde foram mantidos a 32 °C durante 120 minutos, sem agitação. O tempo de incubação foi definido por testes prévios como o tempo necessário para atingir o equilíbrio termodinâmico das amostras.

Para a análise do *headspace*, 1 mL de amostra da fase gasosa contida no frasco foi retirada automaticamente usando uma seringa gas-tight (hermética), pré-aquecida a 35 °C (Gerstel SGE, Victoria, Austrália), e injetada em modo splitless em um cromatógrafo em fase gasosa (GC TRACE Ultra, Thermo Electron, Milão, Itália), acoplado a uma coluna capilar DB-Wax (30 m, 0,32 milímetros d.i., 0,5 µm; Agilent J & W Scientific, Folsom, CA, EUA) e um detector de ionização de chama (FID) regulado para 250 °C. A temperatura do injetor foi fixada em 250 °C. Nitrogênio e ar sintético foram usados como gás de arraste a uma velocidade de 37 cm.s<sup>-1</sup>. A temperatura do forno foi programada para aumentar de 40 a 200 °C a uma taxa de aquecimento de 5 °C.min<sup>-1</sup> e então mantida a 200 °C durante 10 minutos.

#### 4.2.11 Análise Estatística

Os dados foram analisados previamente quanto a sua normalidade pelo método de Shapiro-Wilk e quanto a sua homogeneidade de variância pelo teste de Levene ( $p > 0,05$ ).

Os dados paramétricos foram, então, comparados por análise de variância one-way ANOVA e submetidos ao teste de diferenciação de médias LSD Fisher, enquanto que para os dados não paramétricos foi utilizado o método não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação de médias. Foi utilizado o método de Spearman para correlação (GRANATO, CALADO e JARVIS, 2014). O nível de significância foi determinado a  $p < 0,05$  e as análises estatísticas realizadas com o software Statistica® (versão 10, StatSoft).

A técnica exploratória multivariada foi aplicada para ilustrar as diferenças entre as amostras ( $n = 5$ ) de acordo com suas características de estabilidade e liberação de sal e aromas. Para isso, os dados foram escalonados para equalizar a importância estatística de todas as variáveis e então analisados pelo software Statistica® por meio de técnica de Análise de Componentes Principais (PCA) (NUNES *et al.*, 2015).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1.1 Ensaios Preliminares

Os testes preliminares mostraram ser possível os produzir géis lácteos acidificados com ácido lactobiônico com 12% ou 20% de concentrado proteico de leite. A quantidade necessária de ácido para atingir os valores de pH 6,2 e 5,5 foi menor nos géis com 20% de CPL, devido nesta concentração o pH inicial (amostra controle) ser menor. No entanto, as diferenças entre as massas de LBA e GDL seguiram a mesma proporção, conforme pode ser observado na TABELA 3.

Para atingir o mesmo valor de pH nos géis lácteos acidificados com LBA ou GDL, foram utilizadas quantidades diferentes dos dois compostos (TABELA 3). A quantidade de ácido lactobiônico necessária para a acidificação foi próxima ao dobro da massa de glucono- $\delta$ -lactona.

TABELA 3. CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LACTOBIÔNICO OU GLUCONO- $\delta$ -LACTONA NECESSÁRIOS PARA PRODUZIR GÉIS LÁCTEOS COM pH 6,2 OU 5,5, EM FORMULAÇÕES COM 12 E 20% DE CPL.

	Controle	HGDL	HLBA	LGDL	LLBA
<i>Modelo com 12% CPL</i>					
Concentração de ácido (g)	-	0,35	0,60	1,50	2,80
pH	6,68 <sup>a</sup> $\pm 0,01$	6,22 <sup>b</sup> $\pm 0,02$	6,24 <sup>b</sup> $\pm 0,01$	5,51 <sup>c</sup> $\pm 0,02$	5,52 <sup>c</sup> $\pm 0,02$
<i>Modelo com 20% CPL</i>					
Concentração de ácido (g)	-	0,25	0,50	1,40	2,70
pH	6,59 <sup>a</sup> $\pm 0,01$	6,24 <sup>b</sup> $\pm 0,02$	6,25 <sup>b</sup> $\pm 0,02$	5,50 <sup>c</sup> $\pm 0,02$	5,52 <sup>c</sup> $\pm 0,01$

Nota: HLBA: amostra com pH 6,2 com LBA; HGDL: pH 6,2 com GDL; LGDL: pH 5,5 com GDL; LLBA: pH 5,5 com LBA.

Com apenas um grupamento carboxila ionizável cada (GREEN, YU e VAN SCOTT, 2009), o pK<sub>a</sub> dos dois ácidos é muito próximo: 3,8 para o LBA e 3,7 para a GDL (GUTIÉRREZ, HAMOUDI e BELKACEMI, 2012), sendo assim, ambos tem a mesma capacidade de dissociação. Desta forma, a diferença nas quantidades requeridas de ácido pode ser explicado pela massa molecular dos compostos, onde o ácido lactobiônico apresenta 358,3 Da e a glucono- $\delta$ -lactona 178,14 Da (BURDOCK, 1997; GUTIÉRREZ, HAMOUDI e BELKACEMI, 2012). O pH da amostra controle, sem acidificação, foi em torno de 6,6, próximo ao pH do leite (SCOTT *et al.*, 2002).

Os géis lácteos utilizando 20% de concentrado proteico de leite apresentaram, visualmente, maior estabilidade em relação aos géis testados com 12% de CPL, pois em concentração menor a rede proteica formada sofre rearranjos excessivos,



resultando em perda de estabilidade e sinérese, principalmente para os géis acidificados com GDL (MELLEMA *et al.*, 2002). Lucey, Munro e Singh (1998) também relataram problemas de sinérese em géis lácteos e iogurtes produzidos com glucono- $\delta$ -lactona, possivelmente devido à reorganizações logo após a etapa de coagulação do leite, pois, diferentemente de produtos acidificados por culturas lácticas, a GDL começa a ser hidrolisada à ácido glucônico desde o momento no qual é adicionada.

A sinérese pode influenciar os resultados de estudos comparativos por proporcionar diferenças não controladas nas amostras (GUINEE *et al.*, 2004), por isso é importante que os géis não apresentem, ou apresentem minimamente, este fenômeno. Sendo assim, em todos os experimentos que se seguiram foram utilizados os géis lácteos compostos por 20% de CPL (FIGURA 16). Além disso, os géis com 20% de CPL apresentam conteúdo de matéria seca mais próxima de um queijo fresco, que é de 50 a 20% (LOURENÇO NETO, 2013), como foi proposto no presente trabalho.

Devido aos rearranjos que os géis lácteos tendem a sofrer após a coagulação todos os ensaios foram realizados após período noturno (*overnight*) em geladeira, a fim de minimizar diferenças estruturais entre as análises (MELLEMA *et al.*, 2002).

Com o aumento no teor de extrato seco dos géis, foi necessário acrescentar uma etapa de homogeneização em dispersor Ultra-Turrax ao processo produtivo para garantir a completa dissolução dos ácidos.



FIGURA 16. MODELO LÁCTEO PRODUZIDO COM 20% DE CONCENTRADO PROTEICO DE LEITE.

### 5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As micrografias obtidas com ampliação de 25.000x das amostras de géis lácteos no microscópio eletrônica de varredura (MEV) estão apresentadas na FIGURA 17. Nas imagens é possível visualizar diferenças entre as amostras.

Na FIGURA 17A está representada a amostra Controle, sem adição de ácido e com pH 6,6. A microscopia para esta amostra exhibe uma estrutura fina, aberta e com muitas ramificações. Esta configuração é típica da rede proteica formada por coagulação enzimática, onde há muitas ligações cruzadas entre as micelas de caseína por meio de interações com o cálcio (na forma de CCP), formando pequenas cadeias lineares que se agregam para formar aglomerados e grupos de caseínas, que por fim originam uma rede com aparência fractal (VAN VLIET, LAKEMOND e VISSCHERS, 2004; LUCEY, 2011).

Perfil similar ao da amostra Controle é apresentado na FIGURA 17B, que representa a amostra acidificada com glucono- $\delta$ -lactona com pH 6,2 (HGD L). Todavia uma pequena diferença na conformação das proteínas pode ser apontada para esta amostra, com a formação de aglomerados maiores em meio à rede fina. Lucey e Singh (1998) também encontraram uma microestrutura ramificada e com aparente interconectividade para géis de leite acidificados com GDL que não estava presente em géis acidificados por bactérias lácticas, usando microscopia confocal a laser (CLSM).

As diferenças entre as amostras Controle e HGD L acontecem em função da ligeira alteração do pH de 6,6 para 6,2 entre elas. Com o abaixamento do pH ocorrem diversos efeitos na estrutura das redes de proteína do leite (MCSWEENEY e O'MAHONY, 2016), principalmente pela solubilização do CCP, que causa a redução na quantidade de ligações cruzadas com o cálcio e induz a dissociação das micelas de caseína, além de modificar o balanço entre as interações hidrofóbicas e as repulsões eletrostáticas que estabilizam a rede proteica (PENG, HORNE e LUCEY, 2009). A protonação dos grupos carregados negativamente da proteína pelo ácido neutraliza as cargas expostas e favorece as atrações hidrofóbicas, que fazem com que as partículas de caseína se agrupem. Contudo, em pH 6,2 a solubilização do CCP é parcial e, desta forma, o agrupamento também é parcial (ESTEVEES *et al.*, 2003).

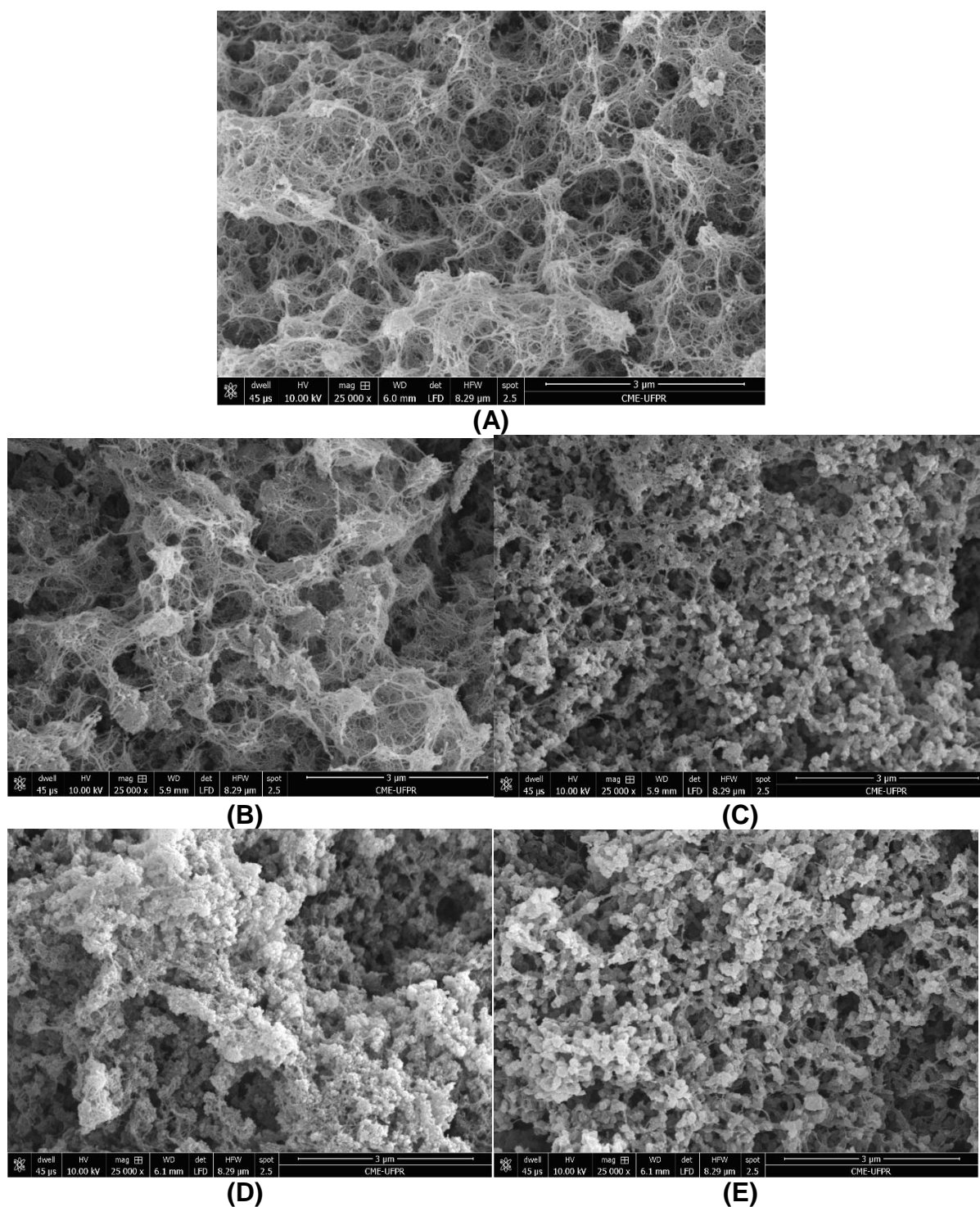


FIGURA 17. MICROGRAFIAS DOS GÉIS LÁCTEOS OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, ONDE AS AMOSTRAS CORRESPONDEM A: (A) CONTROLE; (B) HGDL (C) HLBA (D) LGDL (E) LLBA.

NOTA: HLBA: pH 6,2 COM LBA; HGDL: pH 6,2 COM GDL; LGDL: pH 5,5 COM GDL; LLBA: pH 5,5 COM LBA. ESCALA = 3 µm. AUMENTO = 25.000 VEZES.

Importantes discrepâncias podem ser visualizadas entre as FIGURAS 17B e FIGURA 17C, correspondentes às amostras acidificadas com ácidos diferentes (GDL ou LBA) que apresentam o mesmo pH de 6,2. Na FIGURA 17C, amostra acidificada com ácido lactobiônico (HLBA), a rede proteica apresenta menos ligações de cálcio entre as proteínas do que na amostra na qual foi utilizado glucono- $\delta$ -lactona como acidificante (FIGURA 17B), além de uma estrutura mais agrupada em relação à amostra correspondente. Devido às diferenças entre a amostra HLBA e HGDL, que apresentam o mesmo pH, conclui-se que o efeito do abaixamento do pH não foi unicamente responsável pelas distintas características encontradas para o gel acidificado com ácido lactobiônico.

A estrutura aglomerada da amostra HLBA representa um estágio médio entre as amostras controle ou HGDL, que possuem muitas ramificações, e as amostras com pH 5,5 (LGDL e LLBA), que apresentam estruturas densas, pois, apesar do maior agrupamento, ainda apresenta algumas ramificações.

A possível explicação para o comportamento da amostra HLBA está na capacidade quelante de íons cálcio do ácido lactobiônico, pois presume-se que os agentes quelantes se complexam com o cálcio solúvel da fração aquosa do gel lácteo, alterando o equilíbrio entre o cálcio na forma coloidal e o cálcio solúvel, causando um gradiente de concentração que leva à dissociação do CCP ligado às micelas e, assim, remove parte das ligações entre as proteínas (UDABAGE, MCKINNON e AUGUSTIN, 2000). Entretanto, o decréscimo do CCP na micela causa a exposição dos resíduos de fosfoserina negativamente carregados o que, sem acidificação suficiente para neutralizar estas cargas, aumenta a repulsão eletrostática entre as caseínas, resultando em menor aglomeração entre as proteínas (PENG, HORNE e LUCEY, 2009; KALIAPPAN e LUCEY, 2011). Este resultado está de acordo com o relatado no trabalho de McIntyre, O'Sullivan e O'Riordan (2016), onde os pesquisadores também encontraram rupturas das ligações cruzadas com cálcio em dispersões de caseína pela utilização de agentes quelantes.

Embora a GDL em sua forma hidrolisada (ácido glucônico) também seja relatado como quelante de metais, os resultados encontrados neste trabalho podem indicar que o LBA tem maior capacidade quelante de íons cálcio do que a glucono- $\delta$ -lactona. Contudo, a quantificação do poder quelante dos ácidos em questão ainda necessita ser mensurada em trabalhos futuros.

Nas FIGURA 17D e 17E são apresentadas as amostras LGDL e LLBA, respectivamente, ambas com pH 5,5 e estruturas aglomeradas. Em relação ao efeito do pH, era esperado que em ambiente mais ácido as estruturas se mostrassem mais aglomeradas do que em pH 6,2 para os dois tipos de ácido. Isso ocorre pois quanto maior a adição de substâncias ácidas ( $H^+$ ) para a diminuição pH, maior é a solubilização do CCP e maior a neutralização das cargas negativas das caseínas com consequente redução da repulsão eletrostática entre elas, favorecendo as atrações hidrofóbicas (VAN VLIET, LAKEMOND e VISSCHERS, 2004; KARLSSON, IPSEN e ARDÖ, 2007). Recentemente, os trabalhos de Silva *et al.* (2013) e Koutina *et al.* (2015) também mostraram a formação de uma estrutura proteica mais compacta e densa, com muitas proteínas agregadas, devido à desmineralização das micelas de caseína.

Diferentemente do cenário encontrado para as amostras com pH 6,2, o efeito do tipo de ácido utilizado entre as duas amostras com pH 5,5 é menos evidente, pois, tanto a amostra acidificada com ácido lactobiônico, quanto a com glucono- $\delta$ -lactona apresentam poucas ligações entre proteínas e estruturas agrupadas e tortuosas. Entretanto, a amostra acidificada com glucono- $\delta$ -lactona apresenta aparência ainda mais agrupada do que no gel produzido com ácido lactobiônico.

Acredita-se que as características próximas entre as amostras LGDL e LLBA, neste caso, possam ser explicadas pelo predomínio do efeito do pH sobre o efeito quelante aparentemente mais pronunciado do LBA na microestrutura do gel lácteo devido à extensa solubilização do CCP e neutralização das cargas negativas, fazendo com que ambas as amostras formem estruturas aglomeradas. Além disso, na amostra LLBA, as cargas negativas dos grupamentos fosfoseril que haviam sido expostos pela ruptura das ligações com o cálcio pelo efeito quelante são, então, protonadas pelo ácido (PENG, HORNE e LUCEY, 2009).

De forma geral, a análise microscópica dos géis lácteos revela que as alterações microestruturais nas amostras foram influenciadas tanto pelo pH, como era esperado, mas também pelo tipo de ácido utilizado, principalmente em pH 6,2. O efeito quelante do LBA sobre os íons cálcio modificou fortemente a configuração da rede proteica em relação às amostras com GDL em pH 6,2, porém, as diferenças entre as amostras em pH 5,5 foram menos explícitas.

### 5.1.3 Análises da atividade de água e capacidade de retenção de água nos géis.

Os resultados obtidos sobre a atividade de água ( $a_w$ ) e da capacidade de retenção de água (CRA) dos géis lácteos podem ser visualizados na TABELA 4.

TABELA 4. CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA E ATIVIDADE DE ÁGUA DOS GÉIS LÁCTEOS.

Amostra	pH	Conteúdo de água (g,100g <sup>-1</sup> )	Aw	CRA (%)
Controle	6,6	79,00	0,981 <sup>a</sup> ±0,002	97,76 <sup>b</sup> ±0,41
HGDL	6,2	78,75	0,983 <sup>a</sup> ±0,001	96,72 <sup>c</sup> ±0,16
HLBA	6,2	78,50	0,973 <sup>c</sup> ±0,001	98,31 <sup>a</sup> ±0,31
LGDL	5,5	77,63	0,978 <sup>b</sup> ±0,001	97,68 <sup>b</sup> ±0,13
LLBA	5,5	76,33	0,977 <sup>b</sup> ±0,001	97,81 <sup>b</sup> ±0,28

Nota: Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 4). Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes entre si (p < 0.05). HLBA: amostra com pH 6,2 com LBA; HGDL: pH 6,2 com GDL; LGDL: pH 5,5 com GDL; LLBA: pH 5,5 com LBA.

As principais diferenças significativas entre as amostras foram encontradas para os géis com pH 6,2, onde HGDL apresentou a menor capacidade de retenção de água, enquanto que HLBA, a maior. Com apenas uma ligeira diferença no conteúdo de água na formulação, este fato parece não ter influenciado os resultados, todavia, as diferenças podem ser relacionadas com a microestrutura das amostras.

Segundo Kruif *et al.* (2015), a capacidade de retenção de água depende da densidade de carga e das ligações cruzadas nos produtos lácteos. Desta forma, dois mecanismos podem estar envolvidos na CRA dos géis lácteos. Em pH 6,2, a rede proteica na amostra HGDL é mais espaçada do que na amostra HLBA, facilitando a difusão do solvente pela matriz. Mesmo que a molécula de água seja suficientemente pequena (0,3 nm) para se difundir por ambas as estruturas (WALSTRA e VAN VLIET, 2009), o maior tamanho dos poros na matriz proteica de HGDL pode fazer com que moléculas maiores, como lactose e fragmentos de proteínas, sejam carregadas pela água. Como a análise de CRA é medida por gravimetria, moléculas de maior massa molecular pode aumentar a massa do soro liberado pela amostra na centrifugação (SILVA, LORTAL e FLOURY, 2015).

Em relação aos resultados encontrados para a amostra HGDL, diversos trabalhos relataram problemas de sinérese excessiva em géis lácteos produzidos com GDL, devido à estrutura ramificada que está sujeita a rearranjos conforme o tempo e a pressão (LUCEY *et al.*, 1998; LUCEY, MUNRO e SINGH, 1998; LUCEY *et al.*, 2000;

MELLEMA *et al.*, 2002). Embora sejam conceitos diferentes, a capacidade de retenção de água pode, em alguns casos, ser relacionada com o fenômeno de sinérese do soro em produtos lácteos por representarem resultados referentes à força da rede proteica (MARTÍN-DIANA *et al.*, 2003).

No caso da amostra HLBA, além do maior tamanho dos obstáculos, que funciona como uma peneira para a passagem de moléculas de maior tamanho, há ainda o efeito do ácido lactobiônico, com possível maior capacidade quelante. Pela análise em MEV, é possível visualizar que o LBA reduz com maior intensidade as ligações do cálcio (CCP) e expõe cargas negativas dos grupamentos fosfoserina, além de promover a dissociação das caseínas na micela. As cargas negativas propiciam a hidratação das proteínas, fazendo com que a água interaja mais fortemente com a matriz proteica. Os resultados de atividade de água, sendo menores para a amostra HLBA, corroboram com esta teoria. Além disso, El-Bakry *et al.* (2011a) e El-Bakry *et al.* (2011b), por exemplo, relataram em seus trabalhos o aumento na hidratação das proteínas devido a utilização de agentes quelantes em géis lácteos.

Era esperado que em pH mais baixo a CRA fosse menor devido a expulsão do soro pela neutralização das cargas e pelo aumento da afinidade das interações hidrofóbicas entre as proteínas (VAN VLIET, LAKEMOND e VISSCHERS, 2004). Contudo, para os géis lácteos LGDL e LLBA foi encontrada uma CRA intermediária em relação às demais amostras, sendo maior do que a CRA da amostra HGDL com pH 6,2. Possivelmente, esses resultados estão relacionados à estrutura dos géis com pH 5,5, pois é mais tortuosa e com poros menores, aumentando assim, os obstáculos para a passagem do soro. Como a água não está fortemente ligada à matriz, é provável que a água tenha formado “bolsas” dentro do gel que não puderam ser removidos pela centrifugação das amostras. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Meletharayil, Patel e Huppertz (2015) para géis lácteos com diferentes concentrações de proteína e acidificados com GDL. Contudo, o conteúdo de água das amostras pode ter influenciado na obtenção de valores superestimados de CRA.

Comparando as amostras Controle e HGDL, ambas com estrutura aberta, a amostra Controle apresentou CRA um pouco maior. Isso ocorre pois, até certo limite dependente da composição, quando o valor de pH é alto, géis mais fortes tendem a ser formados, capazes de reter mais água (SIAMAND, DEETH e AL-SAADI, 2014). A redução do pH de 6,6 para 6,2 foi suficiente para reduzir a força do gel HGDL, bem

como para produzir porosidade maior devido ao ligeiro agrupamento de uma fração de proteínas, como visualizado na análise de microscopia.

#### 5.1.4 Análises das propriedades mecânicas dos géis lácteos.

Os resultados das medidas das propriedades mecânicas dos géis lácteos obtidas por meio do perfil de textura instrumental (TPA) para os parâmetros dureza, coesividade e adesividade podem ser observados na FIGURA 18, em combinação com o pH de cada amostra.

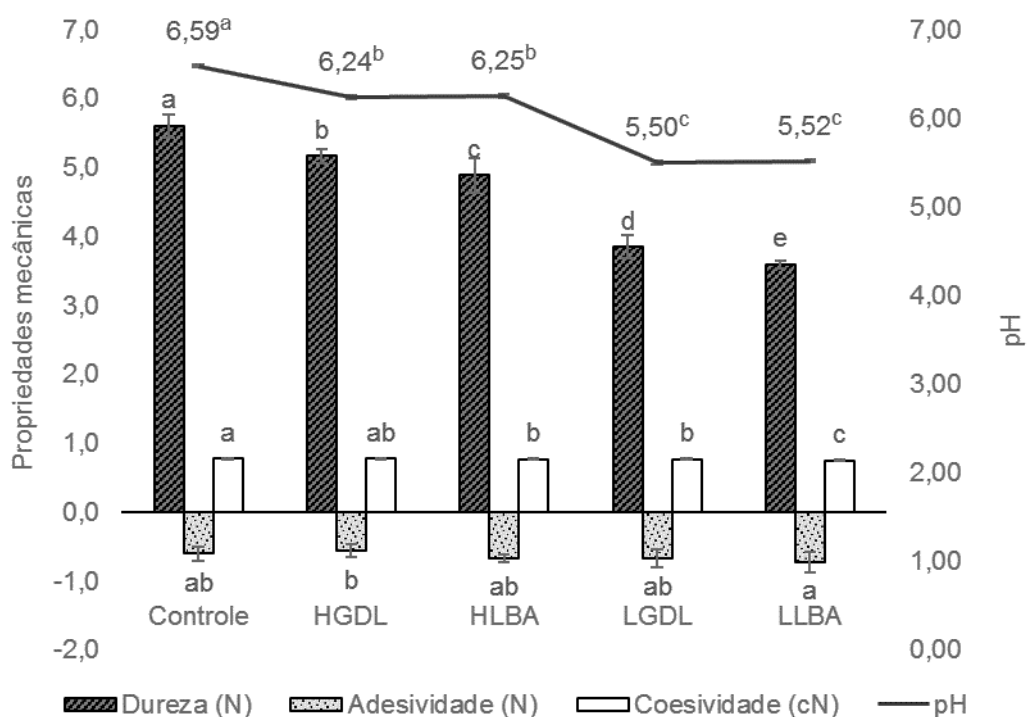


FIGURA 18. PROPRIEDADES MECÂNICAS DE DUREZA, ADESIVIDADE E COESIVIDADE OBTIDAS PELO PERFIL DE TEXTURA INSTRUMENTAL (TPA) DOS GÉIS LÁCTEOS.

Nota: HLBA: amostra com pH 6,2 com LBA; HGDL: pH 6,2 com GDL; LGDL: pH 5,5 com GDL; LLBA: pH 5,5 com LBA.

Os resultados demonstram um claro efeito do pH nas propriedades mecânicas das matrizes lácteas, onde a diminuição do pH causou uma significativa redução na dureza dos géis lácteos. Esta relação também foi descrita nos trabalhos de (VAN VLIET, LAKEMOND e VISSCHERS, 2004; LAKEMOND e VAN VLIET, 2008) envolvendo géis lácteos.

A redução do pH enfraqueceu a estrutura do gel devido à perda de forças intermoleculares entre as partículas de caseína pela solubilização do fosfato de cálcio



coloidal (LUCEY *et al.*, 2000; ESTEVES *et al.*, 2003), refletindo diretamente nos resultados de dureza. Neste mesmo sentido, Lucey *et al.* (1998) reportaram que géis lácteos com maior número de ligações cruzadas apresentam maior dureza, o que está de acordo com os resultados encontrados nas micrografias realizadas por MEV, onde conforme os géis perdem a estrutura fractal o parâmetro dureza também diminui.

Além do efeito do pH, o tipo de ácido utilizado também proporcionou diferenças nas propriedades mecânicas das amostras, pois, em géis com mesmo pH, houve diferença significativa entre os géis acidificados com GDL ou LBA. Os géis lácteos produzidos com ácido lactobiônico foram menos firmes do que os produzidos com glucono- $\delta$ -lactona, resultado observado pelo menor valor de dureza na análise.

Em relação ao efeito do tipo de ácido utilizado, as diferenças são devido ao modo como cada ácido interage com as proteínas que estruturam o gel. A possivelmente maior capacidade quelante de íons cálcio do LBA parece ser a principal causa das amostras acidificadas com este ácido apresentarem estruturas menos rígidas em relação às acidificadas com GDL, devido à indisponibilidade de parte do cálcio para realizar as ligações com a rede proteica, influenciando na solubilidade das proteínas e, conseqüentemente, a dureza dos géis, como reportado por Boisard *et al.* (2013) e Sołowiej, Cheung e Li-Chan (2014) para modelos de queijo.

Para as amostras com pH 5,5, o possível efeito quelante superior do LBA parece ser menos pronunciado, pois a solubilização do cálcio coloidal acontece tanto para amostras com LBA quanto com GDL, devido ao pH mais baixo, mas mesmo assim apresentam diferenças reológicas entre as amostras. Neste caso, como um poli-hidroxiácido, há também a possibilidade que o LBA possa interferir na estrutura proteica por meio de ligações de hidrogênio proporcionadas pelas hidroxilas presentes nas suas moléculas, mais numerosas do que nas moléculas de GDL (AMORNWITTAWAT *et al.*, 2009), ou pelo seu maior tamanho. Desta forma, o LBA pode alterar mais significativamente a estrutura dos géis lácteos.

No parâmetro adesividade não houve diferenciação significativa estatisticamente entre as amostras. Entretanto, em relação ao parâmetro coesividade, o abaixamento do pH e o tipo de ácido utilizado apresentaram comportamento similar ao parâmetro dureza, porém com menor intensidade, o que demonstra que os géis mantiveram suas características estruturais durante a primeira compressão (KIZILOZ, CUMHUR E KILIC, 2009).

### 5.1.5 Estabilidade térmica dos géis lácteos

A estabilidade térmica dos géis lácteos foi estudada por meio da calorimetria exploratória diferencial (DSC). As curvas do fluxo de calor (mW) vs. temperatura (°C) obtidas durante os ensaios podem ser observadas na FIGURA 19, onde podem ser verificados quatro eventos térmicos para as amostras.

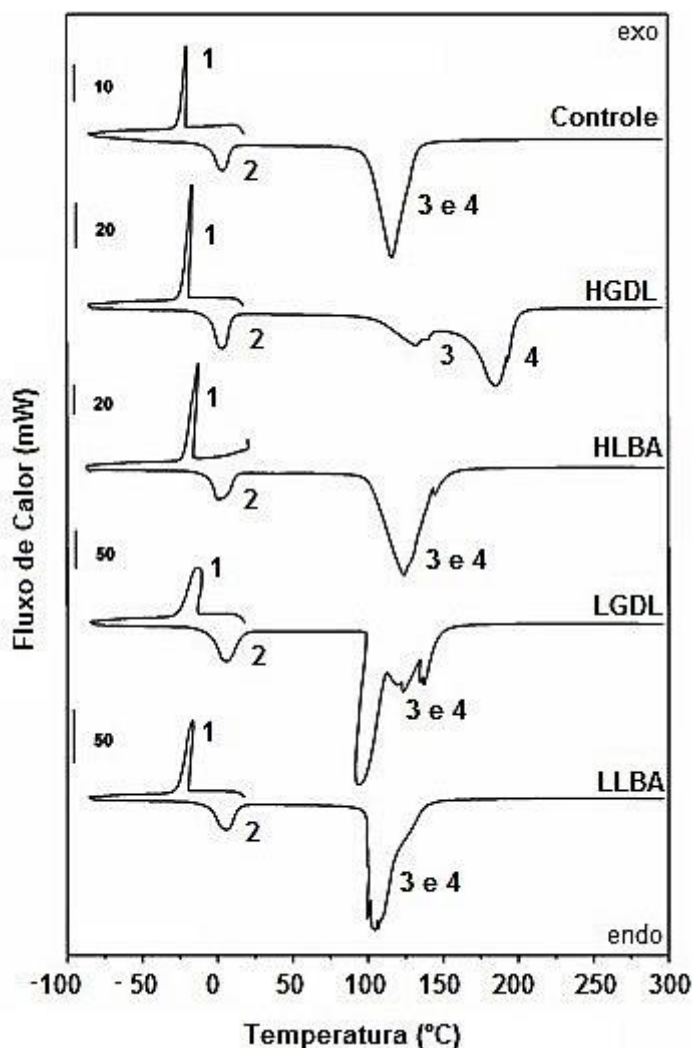


FIGURA 19. CURVAS DE CONGELAMENTO E AQUECIMENTO DO DSC PARA OS GÉIS LÁCTEOS. NOTA: HLBA: amostra com pH 6,2 com LBA; HGDL: pH 6,2 com GDL; LGDL: pH 5,5 com GDL; LLBA: pH 5,5 com LBA. EVENTOS = (1) CRISTALIZAÇÃO DA ÁGUA, (2). FUSÃO DA ÁGUA, (3) E (4) EVAPORAÇÃO DA ÁGUA E DECOMPOSIÇÃO.

O pico 1 é um evento exotérmico referente à cristalização da água das amostras; o pico 2 reporta o evento endotérmico de fusão da água e os picos 3 e 4 apontam a desidratação e decomposição dos géis lácteos também em um evento endotérmico, como pode ser visualizado na FIGURA 20. Para a maioria das amostras,

como a controle, HLBA, LGDL e LLBA, os eventos 3 e 4 estão sobrepostos no gráfico devido à proximidade nas temperaturas em que ocorrem.

A análise termomicroscópica revelou que o evento 3 e 4 não estavam relacionados à fusão das amostras, evento que também é endotérmico, e sim desidratação e decomposição. Não foi observado evento de fusão dos géis lácteos, possivelmente porque o teor de gordura nas formulações é baixo.

A FIGURA 20 mostra a curva obtida pelo DSC para a amostra Controle, com as imagens capturadas pela termomicroscopia, ilustrando suas características nos pontos: (1) amostra antes do início da análise; (2) amostra congelada; (3) início da desidratação da amostra; (4) final da desidratação e (5) característica final da amostra.

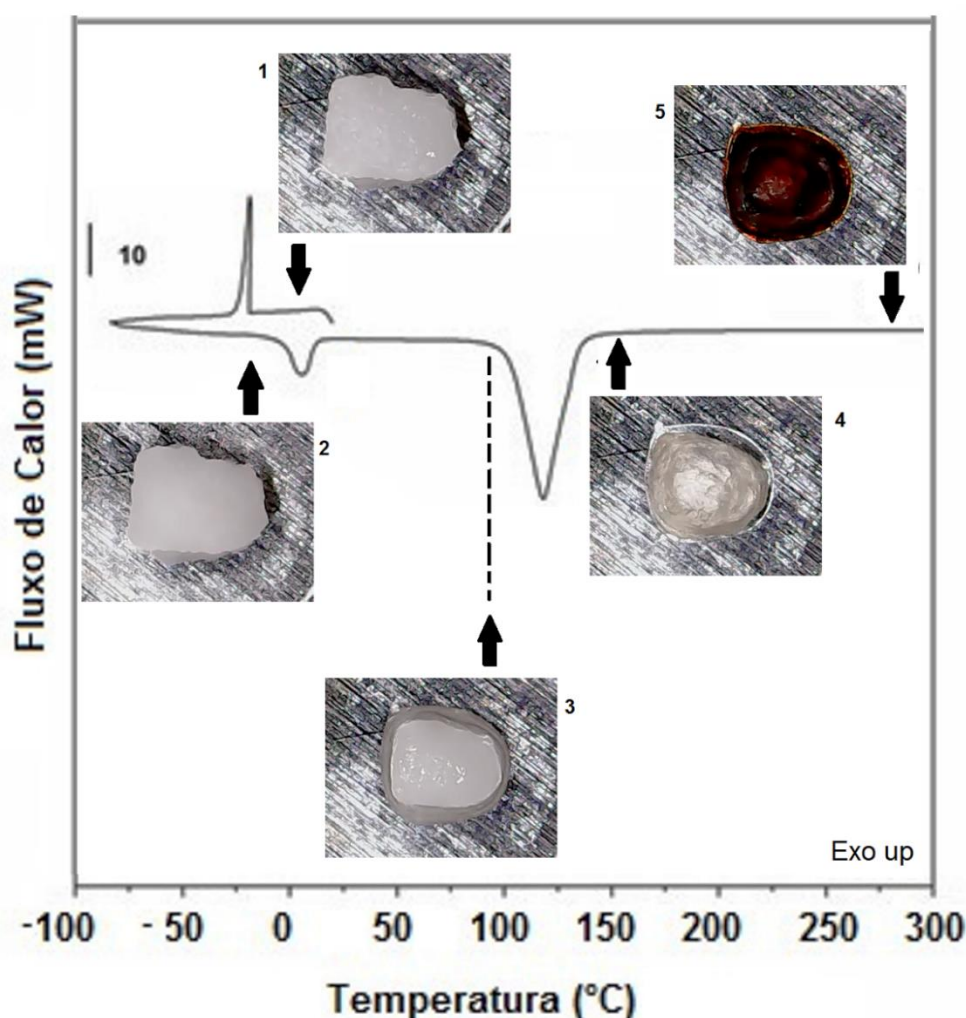


FIGURA 20. TERMOMICROSCOPIA DA AMOSTRA CONTROLE, COM AUMENTO DE 800 VEZES, DURANTE A ANÁLISE DE DSC, ILUSTRANDO (1) AMOSTRA ANTES DO INÍCIO DA ANÁLISE; (2) AMOSTRA CONGELADA; (3) INÍCIO DA EVAPORAÇÃO DA ÁGUA; (4) FINAL DA EVAPORAÇÃO E (5) CARACTERÍSTICA FINAL DA AMOSTRA. AUMENTO = 800 VEZES.

Na TABELA 5 estão relacionadas as temperaturas nas quais cada evento acontece. A temperatura *onset* ( $T_{onset}$ ) representa o início, a temperatura de pico ( $T_{pico}$ ) a temperatura máxima e  $T_c$  a temperatura de conclusão dos eventos térmicos. A energia necessária para o acontecimento de cada evento é dada pela variação da entalpia ( $\Delta H$ ), em  $J.g^{-1}$ , calculada pela área dos picos. O evento 4 nas amostras controle, HLBA, LGDL e LLBA estão sobrepostos, sendo representados em conjunto com o evento 3. Para a amostra HGDL, houve separação dos picos, permitindo o cálculo das temperaturas correspondentes a cada evento.

TABELA 5. RESULTADOS DO EVENTOS TÉRMICOS: (1) CRISTALIZAÇÃO DA ÁGUA, (2). FUSÃO DA ÁGUA, (3 E 4) DESIDRATAÇÃO, OBTIDOS POR DSC DOS GÉIS LÁCTEOS.

Amostra	Evento térmico	$T_{onset}$ (°C)	$T_{pico}$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H$ (J.g <sup>-1</sup> )
Controle	1	-17,00±0,79	-20,35±0,04	-24,65±0,05	154,87±0,42
	2	-4,24 <sup>ab*</sup> ±0,15	3,84 <sup>b</sup> ±0,18	10,06±0,01	186,73 <sup>c</sup> ±5,95
	3	100,46 <sup>ab*</sup> ±0,13	116,59 <sup>ab</sup> ±0,01	132,01±0,04	1372,330 <sup>c</sup> ±1,53
HGDL	1	-14,89±0,21	-16,57±0,02	-20,01±2,48	183,10±0,53
	2	-4,05 <sup>b*</sup> ±0,03	3,62 <sup>b</sup> ±0,02	10,17±0,01	214,27 <sup>a</sup> ±0,91
	3	110,34 <sup>a*</sup> ±0,12	132,49 <sup>a</sup> ±0,01	143,02±0,01	165,70 <sup>d</sup> ±4,47
	4	169,32±0,12	186,10±0,01	199,51±0,02	719,33±14,72
HLBA	1	-10,23±1,15	-12,74±0,15	-15,26±1,18	200,07±0,31
	2	-4,90 <sup>a*</sup> ±0,13	0,46 <sup>c</sup> ±0,04	12,31±0,10	213,87 <sup>a</sup> ±1,70
	3	100,78 <sup>ab</sup> ±0,08	123,88 <sup>ab</sup> ±0,68	142,71±0,11	1525,67 <sup>a</sup> ±10,26
LGDL	1	-10,54±0,29	-13,58±0,33	-19,46±0,35	179,00±0,40
	2	-4,33 <sup>ab*</sup> ±0,21	5,47 <sup>a</sup> ±0,25	16,10±0,03	204,03 <sup>b</sup> ±0,45
	3	91,03 <sup>b*</sup> ±0,77	94,06 <sup>b</sup> ±0,20	135,47±0,31	1404,70 <sup>b</sup> ±2,46
LLBA	1	-16,43±0,47	-16,46±0,22	-19,36±0,08	180,70±1,39
	2	-4,90 <sup>ab*</sup> ±0,04	5,52 <sup>a</sup> ±0,18	13,72±0,06	208,67 <sup>b</sup> ±1,06
	3	98,38 <sup>ab*</sup> ±0,10	104,41 <sup>ab</sup> ±0,27	123,15±0,16	1402,67 <sup>b</sup> ±5,13

Nota:  $T_o$  (°C): Temperatura *onset* (início do evento);  $T_p$  (°C): Temperatura de pico;  $T_c$  (°C): Temperatura de conclusão;  $\Delta H$  (J.g<sup>-1</sup>): variação de entalpia do evento. Letras diferentes para o mesmo evento (1, 2 ou 3) na mesma coluna representam diferenças significativas entre as amostras. \*Dados não paramétricos (Diferença de médias por Kruskal Wallis). HLBA: amostra com pH 6,2 com LBA; HGDL: pH 6,2 com GDL; LGDL: pH 5,5 com GDL; LLBA: pH 5,5 com LBA.

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) não pode ser detectada neste ensaio para nenhum dos géis lácteos analisados, provavelmente devido à limitação de temperatura do aparelho usado, pois, embora a temperatura tenha sido reduzida até  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , esta é ainda muito superior à  $T_g$  da água,  $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e quanto maior o conteúdo de água da amostra, mais próximo à  $T_g$  da água acontece sua transição vítrea (REID e FENNEMA, 2009). Desta forma, como o conteúdo de água dos géis lácteos é em torno de 80 %, provavelmente a  $T_g$  encontra-se abaixo de  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Em relação ao congelamento, os dados de interesse são relativos ao pico de fusão da água (pico 2), onde a temperatura *onset* corresponde à temperatura inicial de congelamento da amostra (BAI *et al.*, 2001). O efeito da utilização de GDL ou LBA e do pH na conservação dos géis por congelamento foi estudado por meio da  $T_{\text{onset}}$  e da entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ), que representa o calor latente de fusão do gelo (MATUDA *et al.*, 2005).

Por meio dos resultados descritos na TABELA 5 é possível observar que, ao contrário do encontrado por Le Dean *et al.* (2001), houve pouca influência do teor de matéria-seca na temperatura de congelamento entre as amostras, que variaram de  $-4,90$  a  $-4,05\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sem diferenças estatisticamente significativas entre elas, exceto para as amostras HGDL e HLBA, onde HLBA apresentou menor temperatura de congelamento. As amostras HGDL e HLBA diferiram em diversos outros parâmetros analisados neste trabalho, contudo, a atividade de água das amostras é a propriedade que melhor explica a diferença de  $T_{\text{onset}}$ , apresentando forte correlação entre as duas análises ( $r = 0,975$ ;  $p < 0,05$ ).

De acordo com Amornwittawat *et al.* (2009), os poli-hidroxiácidos (PHA), como o LBA e o GDL, são conhecidos como moléculas crioprotetoras por diminuir a temperatura de congelamento, fato que pode explicar os resultados obtidos para a amostra com LBA. Para os autores, isto acontece pela diminuição da água livre devido a interação entre os grupos hidroxila dos PHA com a água e que quanto maior o número de hidroxilas na molécula maior é este efeito. Entretanto, além da quantidade de hidroxilas, os resultados apontam que a capacidade quelante do LBA, supostamente maior do que a da GDL devido às observações em MEV e TPA, realçou o efeito no abaixamento da temperatura de congelamento. Fato que pode ter ocorrido porque em pH 6,2 a amostra com LBA possivelmente pode solubilizar mais fortemente as proteínas, como anteriormente discutido, e assim, deprimir o ponto de congelamento da água nas amostras. Contudo, a entalpia de fusão da água não

acompanhou o mesmo perfil, indicando que a energia necessária para a fusão do gelo em água não foi definida de forma principal pela ligação da água com a matriz.

Para a amostra HLBA houve, ainda o deslocamento da temperatura de pico ( $T_{pico}$ ) em relação as outras amostras, possivelmente devido a fusão de cristais amorfos e metaestáveis que são formados quando a água se encontra ligada, enquanto que a água livre forma cristais estáveis de formato hexagonal (YOSHIDA *et al.*, 1992).

Para o evento de desidratação e decomposição, as temperaturas iniciais ( $T_{onset}$ ) variaram entre 91 e 110 °C entre as amostras de géis lácteos, com as temperaturas menores correspondendo às amostras LGDL e LLBA. Isso ocorre devido a alteração da estabilidade térmica pela variação do pH devido mudanças conformacionais nas proteínas, diminuindo a estabilidade térmica da amostra quando o pH é menor e refletindo no deslocamento da temperatura de transição térmica para números menores (WEN *et al.*, 2012). Além disso, a entalpia de desidratação das amostras com pH mais baixo não variou. Desta forma, é possível concluir que em pH 5,5 as amostras acidificadas com LBA ou GDL foram semelhantes, reforçando as características encontradas para estas amostras nas demais análises realizadas neste trabalho.

Para a amostra Controle, a desidratação aconteceu de forma mais homogênea em relação às outras amostras, apresentando um pico com base larga, com uma ligeira oscilação no final do evento. Para a amostra HLBA, o perfil é próximo ao da amostra Controle, porém é possível verificar um pequeno pico exotérmico antes do final da desidratação. Todavia, nas amostras LGDL e LLBA, vários picos exotérmicos são formados durante o evento endotérmico de maior amplitude.

Há diversos fatores que podem influenciar na obtenção dos resultados de desidratação com o perfil de picos apresentado. A primeira consideração a ser feita é que as amostras de géis lácteos são formadas por multicomponentes, que podem apresentar diversos eventos dentro da faixa de temperatura de desidratação como a desnaturação das proteínas do soro, degradação da lactose, dissociação das ligações entre caseínas, causando assim, irregularidades na análise térmica (LE DEAN *et al.*, 2001). Além disso, o evento endotérmico de maior intensidade representa a ruptura das ligações de hidrogênio entre a amostra e a água e sua vaporização, porém, quando ocorre a saída da água da estrutura da amostra, esta tende a se reorganizar estruturalmente, podendo formar novas ligações, o que é um processo exotérmico que

pode ser relacionado aos eventos com liberação de calor de menor intensidade nos gráficos do DSC (FITZSIMONS, MULVIHILL e MORRIS, 2007). O pH mais baixo das amostras LGDL e LLBA que desestabiliza mais fortemente os componentes do gel, como observado pela  $T_{onset}$  de desidratação que foi menor em relação as demais amostras, pode fazer com as estruturas presentes comportamentos distintos frente ao aquecimento.

A amostra HGDL apresentou comportamento diferente de todas as outras amostras quando analisada quanto à estabilidade térmica, mostrando a separação do evento de evaporação em dois picos (3 e 4). Como a temperatura de início do evento nº 3 corresponde as das outras amostras e com o auxílio da termomicroscopia, conclui-se que o evento se trata também de desidratação, porém o valor da entalpia para a evaporação de  $169 \text{ J.g}^{-1}$  é muito menor dos que foram encontrados para as outras formulações, que ultrapassam  $1300 \text{ J.g}^{-1}$ .

Em comparação com os resultados obtidos para a CRA e  $a_w$  da amostra HGDL, os resultados da análise térmica podem sugerir que a ligação da água com a amostra é muito mais fraca do que nas outras amostras e que, como a desidratação mais rápida, os outros eventos envolvidos nesta faixa de temperatura foram deslocados para temperatura mais altas, formando um pico separado do da desidratação. Entretanto, a entalpia de vaporização da água pura apresenta valores maiores do que os encontrados para todas as amostras, sendo de aproximadamente  $2272 \text{ J.g}^{-1}$ , o que pode ser devido a sobreposição de eventos exotérmicos durante a desidratação, como os rearranjos moleculares, fazendo com que a variação da entalpia na faixa de temperatura dos eventos 3 e 4 fosse menor.

O gel HGDL, como visto anteriormente, já havia mostrado resultados distintos em relação às outras amostras de géis lácteos e, então, o perfil encontrado na análise de DSC corrobora com os resultados das análises de microscopia, CRA e  $a_w$ . O maior valor de entalpia para a desidratação da amostra HLBA também está de acordo com as análises anteriores, pois foi considerado que esta amostra era capaz de interagir mais fortemente com a água e, assim, o processo de saída da água da amostra requer maior energia.

### 5.1.6 Efeito na mobilidade e liberação de sal *in vitro* nas matrizes lácteas.

O efeito do pH e do tipo de ácido utilizado na mobilidade dos íons sódio nos géis lácteos foi medida a nível molecular pela técnica de espectroscopia RMN  $^{23}\text{Na}$  e em nível macroscópico pela liberação de sal *in vitro* (LS). Os resultados destas análises para as amostras Controle, HGDL, HLBA, LGDL e LLBA podem ser visualizadas na TABELA 6. As análises de espectroscopia RMN  $^{23}\text{Na}$  foram realizadas na Université de Bourgogne, em parceria com o *Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation* (CSGA – “Centro de ciência do gosto e da alimentação”), INRA, Dijon, França.

TABELA 6. QUANTIFICAÇÃO E MOBILIDADE DOS ÍONS DE SÓDIO NOS GÉIS LÁCTEOS OBTIDOS POR RMN  $^{23}\text{Na}$  E LIBERAÇÃO DE SAL *IN VITRO* (LS) NOS TEMPOS 1 MIN E 60 MIN.

	Controle	HGDL	HLBA	LGDL	LLBA
<i>Quantificação de sódio por RMN <math>\text{Na}^{23}</math></i>					
$[\text{Na}^+]^{\text{SQ}} *$ ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ )	0,95 $\pm$ 0,07	1,01 $\pm$ 0,01	0,99 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,01	1,03 $\pm$ 0,02
Razão $A_{\text{DQ}}/A_{\text{SQ}}^*$	23,05 $\pm$ 4,82 <sup>a</sup>	19,20 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	19,11 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	18,53 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	18,27 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>
<i>Mobilidade de sódio por RMN <math>\text{Na}^{23}</math></i>					
$T_{2s}^{\text{DQ}}$ (ms)	16,64 $\pm$ 1,13	17,83 $\pm$ 0,04	17,29 $\pm$ 0,27	19,09 $\pm$ 0,56	17,37 $\pm$ 0,32
$T_{2f}^{\text{DQ}}$ (ms)*	0,54 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,62 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,62 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,94 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0,98 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
$\tau^{\text{opt}}$ (ms)*	1,92 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	2,17 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	2,14 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	2,97 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	2,98 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>
<i>Liberação de sal <i>in vitro</i> (LS) (<math>\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}</math>)</i>					
t = 1 min	10,53 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	12,08 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	10,95 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup>	10,44 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>	10,30 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>
t = 60 min	119,16 $\pm$ 3,31 <sup>b</sup>	133,62 $\pm$ 5,64 <sup>a</sup>	109,16 $\pm$ 5,96 <sup>c</sup>	123,13 $\pm$ 4,50 <sup>b</sup>	121,49 $\pm$ 4,64 <sup>b</sup>

Nota: Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma linha representam resultados estatisticamente diferentes entre si (p < 0.05). \*Dados não paramétricos.

A real concentração de sódio ( $[\text{Na}^+]^{\text{SQ}}$ ) nas matrizes lácteas (endógena + adicionada) foi quantificada pelo método *single quantum* da espectroscopia RMN  $^{23}\text{Na}$ . Como era esperado, os resultados da quantificação mostraram que as amostras apresentam a mesma concentração de sódio, sem diferenças significativas entre as formulações (p > 0,05), o que está de acordo com a composição homogênea



idealizada para os géis, que foram preparados com a mesma quantidade de sal adicionada (1%).

Em relação à quantificação relativa dos íons sódio “ligados” às proteínas, obtida pela razão entre as áreas dos sinais *double quantum* e *single quantum* (razão  $A_{DQ}/A_{SQ}$ ), as principais diferenças entre as amostras foram em razão do pH, sem apresentar diferenças significativas entre as amostras acidificadas com ácidos diferentes. Desta forma, os géis lácteos com pH 5,5, acidificados tanto com ácido lactobiônico quanto com glucono- $\delta$ -lactona, apresentaram significativamente menos íons de sódio ligados à matriz em relação às amostras com pH 6,2.

Boisard *et al.* (2013) não encontraram diferenças na quantificação de sódio ligados em amostras de modelos de queijo nos quais foi variada a proporção de lipídios/proteína e a dureza, para amostras com o mesmo pH. O mesmo acontece no presente trabalho para as amostras HGD L em comparação à HLBA, e LGDL em relação à LLBA, onde não houve diferença significativa para a quantidade de sódio ligado às amostras. Entretanto, nas amostras com pH diferente, 6,2 ou 5,5, houve diferenças significativas, sugerindo que nos géis lácteos a proporção de sódio ligado à matriz foi afetada pelo pH e não pela estrutura dos géis com suas diferenças reológicas.

O efeito do pH pode ser explicado devido à ligação e à mobilidade do sódio estarem relacionadas com a presença de grupos carregados negativamente nas proteínas do leite, que com o abaixamento do pH são protonados, diminuindo a disponibilidade dos sítios negativos para interagir com os íons de sódio, resultados estes que são condizentes aos encontrados por Mosca *et al.* (2015a). Contudo, neste sentido, o efeito quelante, que aparenta ser maior para a amostra HLBA, não teve influência na quantidade de sódio ligado à matriz, o que levanta a hipótese de que há outros mecanismos envolvidos nesta ligação, fato este que é reforçado por Boisard *et al.* (2013) não terem encontrado diferença em amostras com maior teor de proteína e, consequentemente, mais grupos carregados negativamente. Desta forma, é provável que o pH não seja o único fator a influenciar a ligação com o sódio em modelos produzidos com proteínas de leite.

Quanto à mobilidade dos íons de sódio que se encontravam “ligados” à matriz não houve diferença significativa entre todas as amostras em relação a transição interna (lenta) de íons sódio, porém para o tempo de relaxação externo ( $T_{2f}^{DFQ}$ )

apresenta o mesmo perfil encontrado para a quantificação da fração ligada ( $A_{dq}/A_{sq}$ ), indicando que as diferenças entre as amostras não foram suficientes para modificar a forma como os íons sódio se ligam às matrizes proteicas.

A organização da estrutura proteica em torno dos íons de sódio ( $\tau^{opt}$ ) acompanhou o pH dos géis lácteos, indicando que a redução do pH torna o sistema mais desorganizado, o que também foi possível visualizar na análise microscópica por meio das diferenças encontradas entre as amostras com pH 6,2 e as com pH 5,5, de estruturas fractais a aglomeradas, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os que foram encontrados por Boisard *et al.* (2014) em modelos de queijo e por Gobet *et al.* (2009) em géis de ι-carragena.

Em síntese, a análise sobre a mobilidade de sódio em nível molecular (RMN  $^{23}\text{Na}$ ) mostrou pequenas e pouco significativas diferenças entre as amostras. Além disso, a utilização de LBA ou GDL como acidificante não apresentou modificações na forma como os íons sódio interagem com a matriz proteica. Por outro lado, o estudo macroscópico, por meio da liberação de sal *in vitro* (LS) (TABELA 6), apontou que a amostra HGDL libera o sal mais rapidamente do que as outras amostras, situação que foi encontrada tanto para o tempo igual a 1 min quanto para 60 min. Em 60 min a curva de LS encontra-se estabilizada e, então, foi considerado como ponto final da medição. No tempo final (60 min), é possível verificar um claro efeito da atividade de água e CRA, que por sua vez estão ligados à estrutura dos géis lácteos, na liberação de sal *in vitro*.

Como os resultados da liberação *in vitro* não apresentam similaridade aos encontrados na análise de mobilidade, se pode concluir que os íons que são liberados na análise *in vitro* fazem parte da fração livre de sódio, presente na fase aquosa da matriz proteica, fazendo com que sua liberação dependa apenas de mecanismos físicos relacionados à facilidade de percorrer os caminhos formados pela estrutura dos géis.

#### 5.1.7 Liberação de aroma

A quantidade de “aroma”, representado neste trabalho por compostos orgânicos voláteis (VOC, do inglês: *volatile organic compounds*), liberada dos géis lácteos para a fase vapor (ar) em equilíbrio, foi medida pela análise de cromatografia gasosa-FID do conteúdo do *headspace* dos frascos contendo os diferentes géis

lácteos. Os resultados desta análise foram expressos em relação à amostra controle e podem ser visualizados na FIGURA 21. As análises foram realizadas na plataforma analítica *Chemosens*, do *Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation*, INRA, Dijon, França.

As principais diferenças na quantidade de aroma liberado pelos géis lácteos foram observadas em função do pH, principalmente para os aldeídos, 3-metil butanal e octanal, e para o diacetil. Como o concentrado proteico de leite era composto por uma mistura de proteínas, o efeito do pH possivelmente está relacionado aos diferentes tipos de interações entre os compostos de aroma com as proteínas do soro, com as caseínas, ou com ambas.

Para os aldeídos, compostos que apresentaram maiores diferenças na liberação, o efeito do pH no coeficiente de partição dos aldeídos entre soluções aquosas de  $\beta$ -lactoglobulina e o ar, como acontece na análise de *headspace*, também foi observado por Van Ruth e Villeneuve (2002) para aldeídos alifáticos. Contudo, não foi verificado o mesmo efeito para o diacetil, o que pode ser atribuído a modificações na natureza de interação entre os compostos orgânicos voláteis e as proteínas.

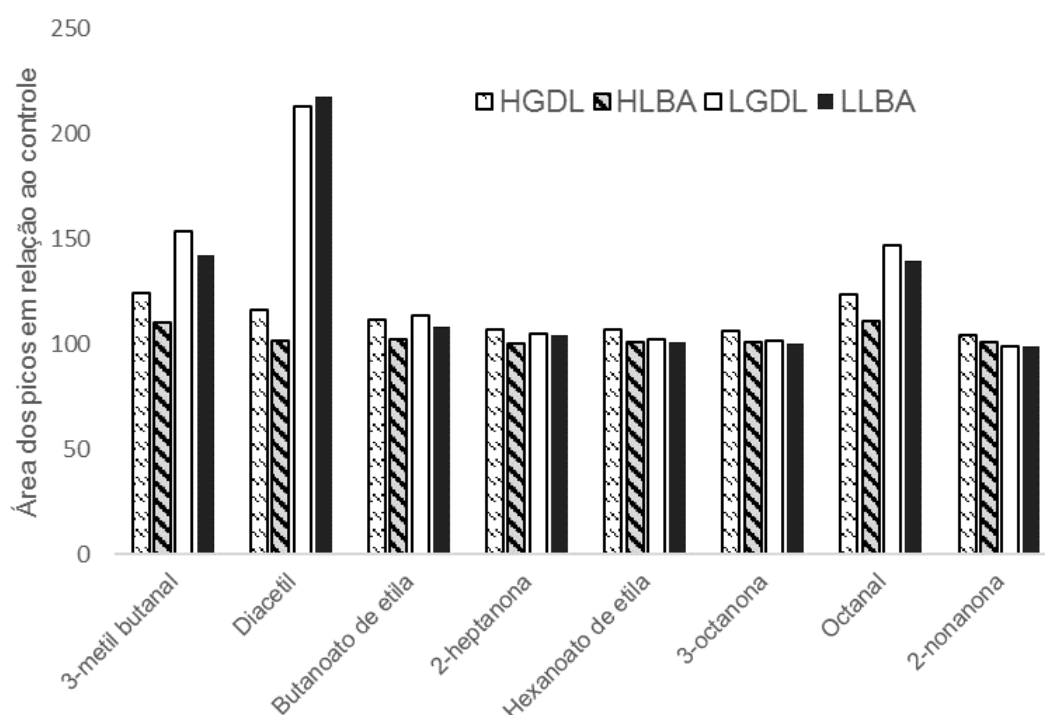


FIGURA 21. LIBERAÇÃO DE AROMA REPRESENTADA PELA RELAÇÃO ENTRE A ÁREA DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS (CG-FID) DOS GÉIS LÁCTEOS HGDL, HLBA, LGDL E LLBA, E A ÁREA DA AMOSTRA CONTROLE.

Os aldeídos alifáticos, como o 3-metil butanal e o octanal, podem interagir com as proteínas do soro de leite por meio de ligações irreversíveis (GUICHARD, 2006; MERABTINE *et al.*, 2010). Sendo assim, Meynier *et al.* (2004) verificaram que os aldeídos alifáticos podem se ligar covalentemente a resíduos histidil e lisil das proteínas do soro. Estas interações ocorrem por meio da reação dos grupos carbonila com o grupo amina livre do resíduo lisil, via de adição de Michael, ou ainda pela adição de dupla ligação ao anel imidazol da histidina. Todavia, estes resíduos estão situados no sítio de ligação externo da  $\beta$ -lactoglobulina (TAVEL *et al.*, 2008) e, desta forma, a modificação do pH, que altera a conformação da proteína, leva a alteração na sua acessibilidade aos compostos de aroma. Jouenne e Crouzet (2000) também reportaram que mudanças no pH modificam o acesso dos VOCs aos sítios de ligação da proteína.

No trabalho realizado por Van Ruth e Villeneuve (2002) não foram encontradas interações significativas entre o composto diacetil e as proteínas do soro, enquanto que Fares *et al.* (1998) sugeriram a ocorrência de uma reação química entre o diacetil e o grupo de amina primária do caseinato de sódio, relacionados com os resíduos lisil. Estes autores também encontraram evidências sobre o efeito do pH nesta ligação, apresentando uma fraca ligação em pH neutro, o que pode ser explicado pela ionização dos grupos carboxila, os quais se tornam menos reativos para ligação. Desta forma, as mudanças no pH neste estudo podem ter sido suficientes para modificar a ligação entre diacetil e caseínas. Além disso, o efeito observado para o diacetil também pode ter sofrido influência das modificações estruturais encontradas nos géis lácteos, visto que uma significativa diminuição na concentração de diacetil no *headspace* foi encontrada por Rankin e Bodyfelt (1996), que consideraram que o aumento da viscosidade em géis lácteos pela adição de emulsificantes como possível causa ao invés das interações moleculares.

A liberação das cetonas e os ésteres nos géis lácteos não foi afetada pelas alterações no pH mas, por outro lado, foi ligeiramente modificada pela natureza do agente acidificante, com uma pequena diminuição na liberação nos géis preparados com LBA em relação aos produzidos com GDL. Este efeito não pode ser explicado pelas diferentes propriedades reológicas encontradas para os géis porque a liberação é reduzida com o aumento da dureza e isso não explica o fato das amostras acidificadas com GDL, que exibem maior dureza do que as com LBA, apresentarem

maior liberação de VOC. Além disso, Juteau-Vigier *et al.* (2007) relataram que a influência da rede proteica foi desprezível na liberação de aromas em seu estudo.

Ésteres e cetonas são conhecidos por interagirem com as proteínas por efeitos hidrofóbicos na cavidade central ou centros hidrofóbicos das proteínas do soro como a  $\beta$ -lactoglobulina (AYED *et al.*, 2014). Como anteriormente discutido, devido sua capacidade quelante de íons cálcio aparentemente maior, o LBA promove a dissociação das frações hidrofóbicas das caseínas, como a  $\beta$ -caseína, que é uma molécula altamente hidrofóbica. Essa dissociação pode permitir o acesso dos VOC aos sítios de ligação hidrofóbicos, fazendo com que a retenção dos ésteres e cetonas seja maior (PERREAULT *et al.*, 2010). O fato de em pH 5,5 não haver diferenças na liberação das cetonas e ésteres entre os géis com GDL ou LBA, corrobora com esta teoria, pois foi possível concluir que neste pH o efeito quelante do LBA é compensado nos géis com GDL pelas alterações promovidas pela acidificação, diminuindo assim as diferenças entre as amostras.

Em pH 5,5 ocorrem alterações conformacionais nas proteínas, onde a interação entre as moléculas é realizada por meio de interações hidrofóbicas, que por sua vez, podem impedir o acesso do VOC aos centros hidrofóbicos e, sendo assim, houve a redução na retenção de aromas.

#### 5.1.8 Análise de componentes principais (PCA) para a liberação de sal e aroma nos géis lácteos.

A FIGURA 22 sintetiza, através de uma análise de componentes principais (PCA), os resultados de pH, CRA,  $a_w$  e propriedades mecânicas encontrados para os géis que apresentaram correlações ( $p < 0,05$ ) com as análises para estudo da liberação de sal *in vitro*, mobilidade e quantificação de sódio ligado e da liberação de aroma nos géis lácteos.

A PCA consegue explicar 81,75% das correlações entre os dados e, assim, é possível concluir que as principais diferenças entre as amostras para as análises discutidas ocorrem em função do pH e da estrutura, representada pela análise de dureza, onde estão diferenciadas as amostras com pH 6,6 e 6,2 das amostras com pH 5,5, fato explicado pela PC 1 (eixo x).

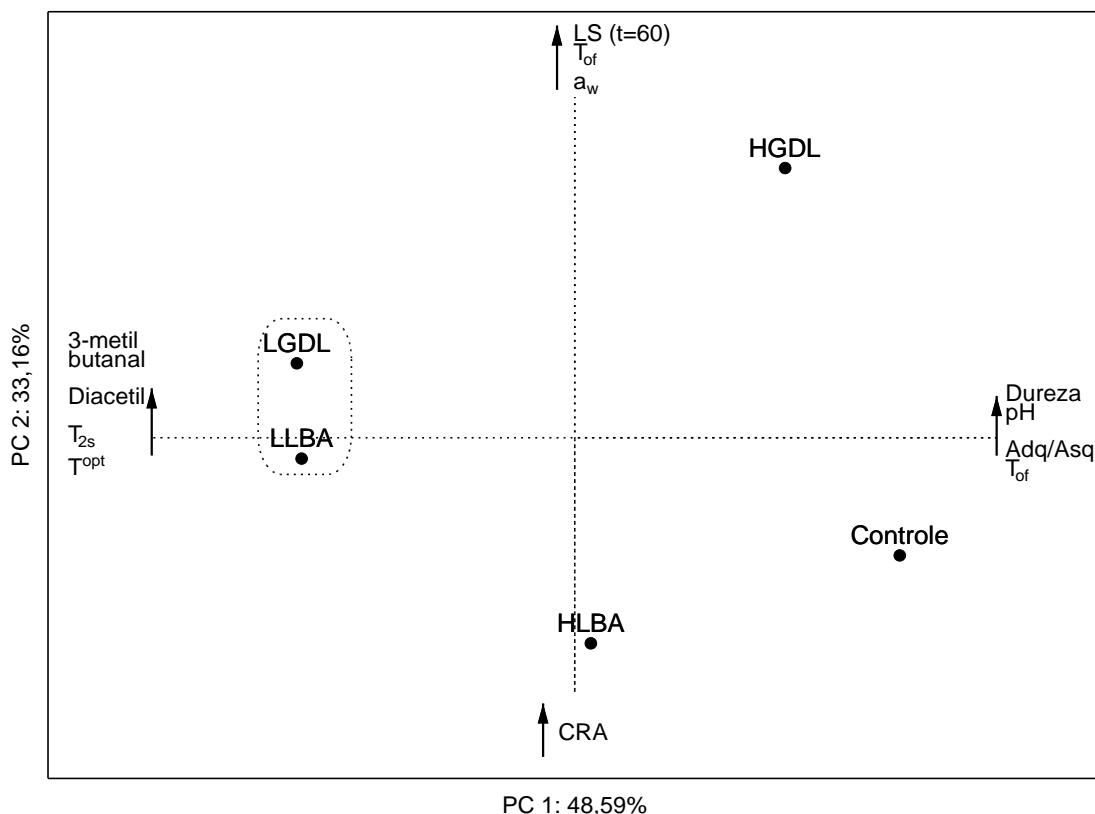


FIGURA 22. GRÁFICO DE DISPERSÃO PC1 vs. PC2 PARA OS GÉIS LÁCTEOS EM FUNÇÃO DAS ANÁLISES DE LIBERAÇÃO DE SAL E AROMA E DE MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS E NO pH. NOTA: LS (t = 60): LIBERAÇÃO DE SAL NO TEMPO 60 MIN;  $T_{of}$ : TEMPERATURA ONSET DE FUSÃO DA ÁGUA; ADQ/ASQ: QUANTIFICAÇÃO DE SÓDIO LIGADO. HLBA: amostra com pH 6,2 com LBA; HGDL: pH 6,2 com GDL; LGDL: pH 5,5 com GDL; LLBA: pH 5,5 com LBA.

Na PC1 estão relacionadas as análises de mobilidade de sódio via espectroscopia RMN  $^{23}\text{Na}$ , na qual a quantificação (Adq/Asq) foi descrita como função tanto da estrutura quanto do pH, onde a acidificação e a perda de dureza indicaram menor quantidade de sódio ligado à matriz, enquanto que a mobilidade ( $T_{2s}$ ) e a desorganização da matriz em torno dos íons sódio ( $\tau^{opt}$ ) aumentaram com a diminuição do pH. Estão também relacionados ao pH e a estrutura, na PC1, as modificações na liberação de aromas encontradas.

A PC2 diferencia a amostra HGDL das amostras Controle e HLBA. Esta diferenciação foi verificada em função da estabilidade da água nas matrizes, onde o gel HLBA apresenta maior CRA e menor  $a_w$ , enquanto que, devido ao perfil contrário, o gel HGDL pode liberar maior quantidade de sal *in vitro* (LS t = 60). Estas modificações em razão do tipo de ácido utilizado são, principalmente, em função da capacidade quelante do LBA que alterou fortemente a estrutura do gel em pH 6,2 em relação à amostra HGDL. Além disso, o PC2 também relaciona a temperatura *onset*

de fusão da água ( $T_{of}$ ) com as características de  $a_w$  das amostras HGDL e HLBA, o que está relacionado à hidratação das proteínas.

Como benefício tecnológico da utilização do ácido lactobiônico como acidificante em géis lácteos é possível apontar sua maior estabilidade frente à perda de água, fato que pode melhorar a conservação dos produtos e reduzir problemas como a sinérese excessiva (FELLOWS, 2006). Entretanto, a liberação de sal é menor para HLBA, o que pode alterar a percepção de gosto dos alimentos.

Os resultados obtidos relacionados à interação do ácido lactobiônico com agente de sabor (sal e aromas) apresentaram poucas diferenças significativas em relação aos géis acidificados com GDL. As modificações na liberação/mobilidade de sal e aromas que ocorreram em função do pH ou em relação ao tipo de acidificante utilizado não podem ser considerados conclusivos em relação à percepção de sal sem que testes sensoriais possam analisar o impacto destas alterações na intensidade de percepção do sabor, pois os resultados sensoriais nem sempre estão correlacionados à mobilidade de sódio ou com a liberação de aromas (LAWRENCE *et al.*, 2009; PFLAUM *et al.*, 2013; MOSCA *et al.*, 2015a; SYARIFUDDIN *et al.*, 2016). Contudo, o estudo realizado neste trabalho pode auxiliar futuras pesquisas sobre o papel do ácido lactobiônico na percepção sensorial.

## 6 CONCLUSÃO

Os géis lácteos produzidos com ácido lactobiônico apresentaram poucas modificações em relação aos produzidos com glucono- $\delta$ -lactona. As principais diferenças entre os géis lácteos acidificados com ácido lactobiônico ou glucono- $\delta$ -lactona foram observadas em pH 6,2, onde os géis acidificados com LBA apresentaram uma estrutura proteica menos ramificada, o que interferiu nas propriedades dos géis lácteos, bem como a solubilidade das proteínas lácteas.

A partir das alterações na microestrutura do gel lácteo, mudanças nas propriedades mecânicas, atividade de água, capacidade de retenção de água, estabilidade térmica e liberação de aromas entre as amostras HGDL e LLBA puderam ser verificadas.

A mobilidade de sódio nos géis lácteos foi alterada apenas em função do pH, sem apresentar efeito da utilização de GDL ou LBA. Em pH igual, a mesma quantidade de sódio está livre nos géis lácteos, entretanto, devido a facilidade de saída da água do gel HGDL, a liberação de sal *in vitro* foi maior para esta amostra.

Nos géis lácteos com pH 5,5 as diferenças entre os géis com LBA ou GDL foram mínimas, em razão do efeito do pH sobressair ao efeito quelante aparentemente maior do LBA. As diferenças entre LGDL e LLBA na microestrutura e nas propriedades mecânicas não foram suficientes para proporcionar alterações nas demais análises.

A utilização do ácido lactobiônico como acidificante em géis lácteos aumentou a estabilidade frente à perda de água, fato que pode melhorar a conservação dos produtos e reduzir problemas como a sinérese excessiva, que é um problema apontado para géis com GDL. Entretanto, a liberação de sal é menor para HLBA, pode alterar a percepção de gosto dos alimentos, além de apresentar menor estabilidade térmica em razão da sua hidratação.

O ácido lactobiônico apresentou propriedades de interesse na área de alimentos, o que incentiva que estudos sobre a segurança da sua utilização como aditivo alimentar continuem a ser realizados para que este possa ser recomendado formalmente para uso industrial.



## **7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS**

Este trabalho teve o intuito de iniciar os estudos sobre a aplicação do ácido lactobiônico em alimentos por meio da pesquisa em géis lácteos. Contudo, os resultados obtidos despertam o interesse sobre novas aplicações e propriedades para este ácido como aditivo em alimentos, promovendo a necessidade da continuidade desta pesquisa. Dentre tantos pontos que poderiam ser propostos, há algumas sugestões relevantes como:

- Análise sensorial de produtos com ácido lactobiônico.
- Testes da capacidade de retenção de água em produtos de panificação e embutidos cárneos.
- Diminuição do tempo de fabricação para queijo muçarela.
- Interação termodinâmica com minerais, proteínas e aromas.
- Aplicação em iogurtes e queijos frescos para evitar a sinérese.
- Estudo sobre a capacidade quelante do ácido lactobiônico.
- Estudos sobre a capacidade prebiótica do LBA.

## 8 CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS

- **Artigo publicado:**

RIBEIRO, J. C. B.; GRANATO, D.; MASSON, M. L.; ANDRIOT, I. ; MOSCA, A. C.; SALLES, C.; GUICHARD, E.. Effect of lactobionic acid on the acidification, rheological properties and aroma release of dairy gels. Food Chemistry, v. 207, p. 101-106, 2016.

- **Apresentação de trabalho em congresso internacional:**

RIBEIRO, J. C. B.; MOSCA, A. C.; MASSON, M. L.; GUICHARD, E.; SALLES, C. Interactions between Na<sup>+</sup> ions and protein matrices: binding, mobility and *in vitro* release of Na<sup>+</sup> ions 9th International Taste Nutrition Health Congress, 2014, Dijon, France.

- **Artigos submetidos ou em finalização:**

BISINELLA, R. Z. B.; RIBEIRO, J. C. B.; MASSON, M. L.; SOLTOVSKI, C. COLMAN, T. A. D.; SCHNITZLER, E.. Some instrumental methods applied in food chemistry to characterize lactulose and lactobionic acid (Short communication). Submetido à revista Food Chemistry.

RIBEIRO, J. C. B.; GRANATO, D.; SCHNITZLER, E; GUICHARD, E.; MASSON, M. L.. Stability of dairy gels produced with Lactobionic acid. Artigo completo em finalização.

## REFERÊNCIAS

- ABBADI, A.; GOTLIEB, K. F.; B. M. MEIBERG, J.; A. PETERS, J.; VAN BEKKUM, H. New Ca-sequestering materials . based on the oxidation of the hydrolysis products of lactose. **Green Chemistry**, v. 1, n. 5, p. 231-235, 1999.
- ADEBOLA, O. O.; CORCORAN, O.; MORGAN, W. A. Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 75-84, 2014.
- AFFERTSHOLT, T. Dairy and whey ingredients - market and industry trends. In: CONSULTING, A. B., **ADPI/ABI Annual Conference**, 2010, Chicago.
- AKASHE, A.; BALDWIN, C.; KOKA, R.; MARQUEZ-SANCHEZ, M.; ZELLER, B. L. **Mineral complexes of lactobionic acid and method of using for mineral fortification of food products**. US 20070026110 A1: 28 set. 2006, 1 fev. 2007.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-shift conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9730-9736, 2011.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1275-1291, 2013.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 314-323, 2015.
- AMORNWITTAWAT, N.; WANG, S.; BANATLAO, J.; CHUNG, M.; VELASCO, E.; DUMAN, J. G.; WEN, X. Effects of polyhydroxy compounds on beetle antifreeze protein activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 2, p. 341-346, 2009.
- ANDRIOT, I.; HARRISON, M.; FOURNIER, N.; GUICHARD, E. Interactions between Methyl Ketones and  $\beta$ -Lactoglobulin: Sensory Analysis, Headspace Analysis, and Mathematical Modeling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4246-4251, 2000.
- AYED, C.; LUBBERS, S.; ANDRIOT, I.; MERABTINE, Y.; GUICHARD, E.; TROMELIN, A. Impact of structural features of odorant molecules on their retention/release behaviours in dairy and pectin gels. **Food Research International**, v. 62, n. 0, p. 846-859, 2014.

BAI, Y.; RAHMAN, M. S.; PERERA, C. O.; SMITH, B.; MELTON, L. D. State diagram of apple slices: glass transition and freezing curves. **Food Research International**, v. 34, n. 2–3, p. 89-95, 2001.

BELLOQUE, J.; RAMOS, M. Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 10, p. 313-320, 1999.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; KOMES, D.; DUJMOVIĆ, M.; KARLOVIĆ, S.; BIŠKIĆ, M.; BRNČIĆ, M.; JEŽEK, D. Physical, bioactive and sensory quality parameters of reduced sugar chocolates formulated with natural sweeteners as sucrose alternatives. **Food Chemistry**, v. 167, p. 61-70, 2015.

BEMILLER, J. N.; HUBER, K. C. Carboidratos. In: FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. (Ed.). **Química de Alimentos de Fennema**: Porto Alegre: Artmed, 2010. p.75-129.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The Microbiology of Cheese Ripening. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H., *et al* (Ed.). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: General Aspects**. London: Elsevier Academic Press: 2004. p. 287-318.

BERNSTEIN, E. F.; BROWN, D. B.; SCHWARTZ, M. D.; KAIDBEY, K.; KSENZENKO, S. M. The Polyhydroxy Acid Gluconolactone Protects Against Ultraviolet Radiation in an In Vitro Model of Cutaneous Photoaging. **Dermatologic Surgery**, v. 30, n. 2, p. 189-196, 2004.

BERTOLINO, M.; DOLCI, P.; GIORDANO, M.; ROLLE, L.; ZEPPA, G. Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1001-1011, 2011.

BERTRAND, E.; MEYER, X.-M.; MACHADO-MATURANA, E.; BERDAGUÉ, J.-L.; KONDOYAN, A. Modelling the Maillard reaction during the cooking of a model cheese. **Food Chemistry**, v. 184, p. 229-237, 2015.

BOBBO, T.; CIPOLAT-GOTET, C.; BITTANTE, G.; CECCHINATO, A. The nonlinear effect of somatic cell count on milk composition, coagulation properties, curd firmness modeling, cheese yield, and curd nutrient recovery. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5104-5119, 2016.

BOELRIJK, A. E. M.; SMIT, G.; WEEL, K. G. C.; BURGER, J. J. 12 - Flavour release from liquid food products. In: VOILLEY, A. e ETIÉVANT, P. (Ed.). **Flavour in Food**: Woodhead Publishing, 2006. p.260-284.

BOISARD, L.; ANDRIOT, I.; ARNOULD, C.; ACHILLEOS, C.; SALLES, C.; GUICHARD, E. Structure and composition of model cheeses influence sodium NMR mobility, kinetics of sodium release and sodium partition coefficients. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 1070-1077, 2013.

BOISARD, L.; ANDRIOT, I.; MARTIN, C.; SEPTIER, C.; BOISSARD, V.; SALLES, C.; GUICHARD, E. The salt and lipid composition of model cheeses modifies in-mouth flavour release and perception related to the free sodium ion content. **Food Chemistry**, v. 145, n. 0, p. 437-444, 2014.

BOUHSINA, S.; DECOCK, P.; KOZLOWSKI, H.; MICERA, G.; SWIATEK, J. Copper(II) complexes of lactobionic acid. Lactone-acid equilibrium and proton dissociation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 57-65, 1991.

BOURNE, M. C. **Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement**. Londres: Academic Press, 2002.

BRADBURY, A. G. W.; FRITSCH, R.; HABERMEIER, P.; KOKA, R.; MEHNERT, D. W.; ROSE, M.; STEFFAN, W.; WOLFSCHOON-POMBO, A. **Process for manufacturing cheeses and other dairy products and products thereof**. WO 2002089592 A1: 7 mai. 2002, 14 nov. 2002.

BRASIL. **Portaria N° 146, de 07 de março de 1996. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos**. ABASTECIMENTO, M. D. A. E. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo, 1996.

BREW, K.  $\alpha$ -Lactoalbumin. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H (Ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd Edition, Four-Volume set**. London: Elsevier Science, 2011. p. 780-786.

BRITTEN, M.; GIROUX, H. J. Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4-6, p. 609-617, 2001.

BROQUIST, H. P.; ALVIN, R. W.; WINTERBOTTOM, R. Process of preserving dressed poultry. US 2930702 A: 28 mar. 1956, 29 mar. 1960.

BROSIO, E.; DELFINI, M.; DI NOLA, A.; D'UBALDO, A.; LINTAS, C.  $^1\text{H}$  and  $^{23}\text{Na}$  NMR relaxation times study of pectin solutions and gels. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)**, v. 39, n. 6, p. 583-588, 1993.

BURDOCK, G. A. **Encyclopedia of Food and Color Additives**. Nova Iorque: CRC-Press, 1997.

BUSCH, J. L. H. C.; YONG, F. Y. S.; GOH, S. M. Sodium reduction: Optimizing product composition and structure towards increasing saltiness perception. **Trends in Food Science & Technology**, v. 29, n. 1, p. 21-34, 2013.

BYLUND, G. **Dairy processing handbook**. Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB, 2015.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: Quo vadis? **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 284-295, 2015.

CARVALHO, R. J.; DE SOUZA, G. T.; HONÓRIO, V. G.; DE SOUSA, J. P.; DA CONCEIÇÃO, M. L.; MAGANANI, M.; DE SOUZA, E. L. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**, v. 52, p. 59-65, 2015.

CFR. **Food additives permitted for direct addition to food for human consumption**. cap. 21: CFR172.720 2015. ADMINISTRATION, U. S. F. A. D., 2015.

CHABANET, C.; TARREGA, A.; SEPTIER, C.; SIRET, F.; SALLES, C. Fat and salt contents affect the in-mouth temporal sodium release and saltiness perception of chicken sausages. **Meat Science**, v. 94, n. 2, p. 253-261, 2013.

CHANDRAPALA, J.; WIJAYASINGHE, R.; VASILJEVIC, T. Lactose crystallization as affected by presence of lactic acid and calcium in model lactose systems. **Journal of Food Engineering**, v. 178, p. 181-189, 2016.

CHEN, G.; LI, D.; LI, J.; LUO, Y.; WANG, J.; SHI, X.; GUO, R. Targeted delivery of doxorubicin by lactobionic acid-modified laponite to hepatocarcinoma cells. **Journal of Controlled Release**, v. 213, p. e34, 2015.

CHEN, J.; ROSENTHAL, A. Food texture and structure. In: CHEN, J. e ROSENTHAL, A. (Ed.). **Modifying Food Texture: Novel Ingredients and Processing Techniques**: London: Elsevier Science, 2015. p.3-22.

CHEN, Y.-C.; CHEN, C.-C.; CHEN, S.-T.; HSIEH, J.-F. Proteomic profiling of the coagulation of milk proteins induced by glucono-delta-lactone. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 137-143, 2016.

CITRARO, R.; SCICCHITANO, F.; DE FAZIO, S.; RAGGIO, R.; MAINARDI, P.; PERUCCA, E.; DE SARRO, G.; RUSSO, E. Preclinical activity profile of  $\alpha$ -lactoalbumin, a whey protein rich in tryptophan, in rodent models of seizures and epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 95, n. 1–2, p. 60-69, 2011.

COLMAN, M. D.; LAZZAROTTO, S. R. D. S.; LAZZAROTTO, M.; HANSEL, F. A.; COLMAN, T. A. D.; SCHNITZLER, E. Evolved gas analysis (TG-DSC-FTIR) and (Pyr-GC-MS) in the disposal of medicines (aceclofenac). **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, 2016.

COSTELL, E.; PEYROLON, M.; DURAN, L. Influence of texture and type of hydrocolloid on perception of basic tasted in carrageenan and gellan gels. **Food Science and Technology International**, v. 6, p. 495, 2000.

CREAMER, L. K.; LOVEDAY, S. M.; SAWYER, L. Milk proteins:  $\beta$ -Lactoglobulin. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd Edition, Four-Volume set**. London: Elsevier Science, 2011. p.787-794.

DE LOUBENS, C.; PANOUILLÉ, M.; SAINT-EVE, A.; DÉLÉRIS, I.; TRÉLÉA, I. C.; SOUCHON, I. Mechanistic model of in vitro salt release from model dairy gels based on standardized breakdown test simulating mastication. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 161-168, 2011.

DEKKER, P. J. T.; DAAMEN, C. B. G. Enzymes exogenous to milk in dairy technology:  $\beta$ -D-Galactosidase. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences, Second Edition**. London: Elsevier, 2011.

DHARIWAL, A.; MAVROV, V.; SCHROEDER, I. Production of lactobionic acid with process integrated electrochemical enzyme regeneration and optimisation of process variables using response surface methods (RSM). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 1–2, p. 64-69, 2006.

DRAGO, S. R.; PANOUILLÉ, M.; SAINT-EVE, A.; NEYRAUD, E.; FERON, G.; SOUCHON, I. Relationships between saliva and food bolus properties from model dairy products. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 4, p. 659-667, 2011.

DU, C.; LI, L.; WANG, H.; ZHANG, J.; YANG, X.; LI, C.; QIAO, R. Hepatocyte targeting and sustained release activity of water-soluble anti-HBV prodrug: Lactobionic acid grafted chitosan–lamivudine conjugate. **Reactive and Functional Polymers**, v. 98, p. 48-55, 2016.

EL-BAKRY, M.; DUGGAN, E.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Casein hydration and fat emulsification during manufacture of imitation cheese, and effects of emulsifying salts reduction. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 2, p. 179-187, 2011a.

EL-BAKRY, M.; DUGGAN, E.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Effect of chelating salt type on casein hydration and fat emulsification during manufacture and post-manufacture functionality of imitation cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 102, n. 2, p. 145-153, 2011b.

EMORINE, M.; MIELLE, P.; MARATRAY, J.; SEPTIER, C.; THOMAS-DANGUIN, T.; SALLES, C. Use of Sensors to Measure In-Mouth Salt Release During Food Chewing. **IEEE Sensors Journal**, v. 12, n. 11, p. 3124-3130, 2012.

ERCILI-CURA, D.; HUPPERTZ, T.; KELLY, A. L. Enzymatic modification of dairy product texture. In: CHEN, J. e ROSENTHAL, A. (Ed.). **Modifying Food Texture: Novel Ingredients and Processing Techniques**. London: Elsevier Science, 2015.

ESTEVES, C. L. C.; LUCEY, J. A.; WANG, T.; PIRES, E. M. V. Effect of pH on the Gelation Properties of Skim Milk Gels Made From Plant Coagulants and Chymosin. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 8, p. 2558-2567, 2003.

FARES, K.; LANDY, P.; GUILARD, R.; VOILLEY, A. Physicochemical Interactions Between Aroma Compounds and Milk Proteins: Effect of Water and Protein Modification. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 1, p. 82-91, 1998.

FARRELL, H. M. Milk Proteins | Casein Nomenclature, Structure, and Association In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. San Diego: Academic Press, 2011. p.765-771.

FEENEY, E. P.; GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Effect of pH and Calcium Concentration on Proteolysis in Mozzarella Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 7, p. 1646-1654, 2002.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M.; MORRIS, E. R. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 4, p. 638-644, 2007.

FLOURY, J.; CAMIER, B.; ROUSSEAU, F.; LOPEZ, C.; TISSIER, J. P.; FAMELART, M. H. Reducing salt level in food: Part 1. Factors affecting the manufacture of model cheese systems and their structure-texture relationships. **LWT–Food Science and Technology**, v. 42, p. 1611, 2009.

FOX, P. F. Lactose: Chemistry, Properties. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd Edition, Four-Volume set**: London: Elsevier Science, 2011.

FU, F.; WEN, S.; ZHU, J.; SHI, X. Encapsulation of doxorubicin within lactobionic acid-modified multifunctional poly(amidoamine) dendrimers for targeted therapy of liver cancer cells. **Journal of Controlled Release**, v. 213, p. e31-e32, 2015.

FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd Edition, Four-Volume set**. London: Elsevier Science, 2011.

GÄNZLE, M. G. Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 116-122, 2012.



GÄNZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685-694, 2008.

GARCÍA-CAYUELA, T.; DÍEZ-MUNICIO, M.; HERRERO, M.; MARTÍNEZ-CUESTA, M. C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T.; MORENO, F. J. Selective fermentation of potential prebiotic lactose-derived oligosaccharides by probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 38, n. 1, p. 11-15, 2014.

GIERCZYNSKI, I.; LABOURE, H.; GUICHARD, E. *In Vivo* Aroma Release of Milk Gels of Different Hardnesses: Inter-individual Differences and Their Consequences on Aroma Perception. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1697–1703, 2008.

GIERCZYNSKI, I.; LABOURÉ, H.; SÉMON, E.; GUICHARD, E. Impact of Hardness of Model Fresh Cheese on Aroma Release: *In Vivo* and *in Vitro* Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 3066-3073, 2007.

GOBET, M.; MOUADDAB, M.; CAYOT, N.; BONNY, J.-M.; GUICHARD, E.; LE QUÉRÉ, J.-L.; MOREAU, C.; FOUCAT, L. The effect of salt content on the structure of iota-carrageenan systems: <sup>23</sup>Na DQF NMR and rheological studies. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 307-312, 2009.

GOBET, M.; RONDEAU-MOURO, C.; BUCHIN, S.; LE QUÉRÉ, J.-L.; GUICHARD, E.; FOUCAT, L.; MOREAU, C. Distribution and mobility of phosphates and sodium ions in cheese by solid-state <sup>31</sup>P and double-quantum filtered <sup>23</sup>Na NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 297-303, 2010.

GRANATO, D.; DE ARAÚJO CALADO, V. M.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137-149, 2014.

GREEN, B. A.; YU, R. J.; VAN SCOTT, E. J. Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 495-501, 2009.

GUICHARD, E. Flavour retention and release from protein solutions. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 226-229, 2006.

GUICHARD, E.; LANGOURIEUX, S. Interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and flavour compounds. **Food Chemistry**, v. 71, n. 3, p. 301-308, 2000.

GUINEE, T. P.; CARIC, M.; KALAB, M. Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, L. H. P.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Ed.). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. London: Elsevier, v.2, 2004. p. 349-350,

GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, L. H. P.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Ed.). **Cheese:**

**Chemistry, Physics and Microbiology**: London: Academic Press, v. 1, 2004. p.207-259.

GUJONSDOTTIR, M.; TRAORE, A.; RENOU, J. P. The Effect of Crystal Size and Encapsulation of Salt on Sodium Distribution and Mobility in Bread as Studied with  $^{23}\text{Na}$  Double Quantum Filtering NMR. In: DUYNHOVEN, J.; BELTON, P. S.; WEBB, G. A.; AS, H. (Ed.). **Magnetic Resonance in Food Science: Food for Thought**: Londres: The Royal Society of Chemistry, 2013. p.35-43.

GUTIÉRREZ, L.-F.; BAZINET, L.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. Production of lactobionic acid by means of a process comprising the catalytic oxidation of lactose and bipolar membrane electrodialysis. **Separation and Purification Technology**, v. 109, p. 23-32, 2013.

GUTIÉRREZ, L.-F.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 103-111, 2012.

HATAKEYAMA, T.; TANAKA, M.; KISHI, A.; HATAKEYAMA, H. Comparison of measurement techniques for the identification of bound water restrained by polymers. **Thermochimica Acta**, v. 532, p. 159-163, 2012.

HAUG, I. J.; SKAR, H. M.; VEGARUD, G. E.; LANGSRUD, T.; DRAGET, K. I. Electrostatic effects on  $\beta$ -lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2287-2293, 2009.

HERR, B. Types and Functions of Additives in Dairy Products. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**: Elsevier Science, 2011.

HERRERA, J. R.; MACKIE, I. M. Cryoprotection of frozen-stored actomyosin of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by some sugars and polyols. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 91-97, 2004.

HORNE, D. S. Casein, Micellar Structure. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd Edition, Four-Volume set**: Elsevier Science, 2011. p.772-779.

HORNE, D. S.; BANKS, J. M. Rennet-induced Coagulation of Milk. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Ed.). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: General Aspects**. Elsevier Science, 2004.

ISAACSON, Y.; CHENSNY, L.; SHEPHERD, R. E.; ZHANG, S.; KORTES, R.; JOHN, K. Lactobionic and gluconic acid complexes of FeII and FeIII; control of oxidation pathways by an organ transplantation preservative. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 23-48, 1993.

JANG, H.; MATSUDA, A.; JUNG, K.; KARASAWA, K.; MATSUDA, K.; OIDA, K.; ISHIZAKA, S.; AHN, G.; AMAGAI, Y.; MOON, C.; KIM, S.-H.; ARKWRIGHT, P. D.; TAKAMORI, K.; MATSUDA, H.; TANAKA, A. Skin pH Is the Master Switch of Kallikrein 5-Mediated Skin Barrier Destruction in a Murine Atopic Dermatitis Model. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 1, p. 127-135, 2016.

JOUENNE, E.; CROUZET, J. Effect of pH on retention of aroma compounds by b-lactoglobulin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1273, 2000.

JUTEAU-VIGIER, A.; ATLAN, S.; DELERIS, I.; GUICHARD, E.; SOUCHON, I.; TRELEA, I. C. Ethyl Hexanoate Transfer Modeling in Carrageenan Matrices for Determination of Diffusion and Partition Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3577-3584, 2007.

KALIAPPAN, S.; LUCEY, J. A. Influence of mixtures of calcium-chelating salts on the physicochemical properties of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 9, p. 4255-4263, 2011.

KARLSSON, A. O.; IPSEN, R.; ARDÖ, Y. Influence of pH and NaCl on rheological properties of rennet-induced casein gels made from UF concentrated skim milk. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 9, p. 1053-1062, 2007.

KIJOWSKI, R.; HOPPENSTEADT, D.; JESKE, W.; FAREED, J. Protamine sulfate neutralization of the anticoagulant activity of aprosulate, a synthetic sulfated lactobionic acid amide. **Thrombosis Research**, v. 73, n. 5, p. 349-359, 1994.

KIM, M. J.; SON, H. J.; KIM, Y.; MISAKA, T.; RHYU, M.-R. Umami–bitter interactions: The suppression of bitterness by umami peptides via human bitter taste receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 456, n. 2, p. 586-590, 2015.

KIRYU, T.; KISO, T.; NAKANO, H.; OOE, K.; KIMURA, T.; MURAKAMI, H. Involvement of *Acetobacter orientalis* in the production of lactobionic acid in Caucasian yogurt ("Caspian Sea yogurt") in Japan. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 25-34, 2009.

KIRYU, T.; OOE, K.; KIMURA, T.; KISO, T.; NAKANO, H.; MURAKAMI, H. Sugar oxidation profiles of membrane-bound dehydrogenase from *Acetobacter orientalis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 262-263, 2012.

KIZILOZ, M. B.; CUMHUR, O.; KILIC, M. Development of the structure of an imitation cheese with low protein content. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1596-1601, 2009.

KONG, W.; ZHANG, T.; FENG, D.; XUE, Y.; WANG, Y.; LI, Z.; YANG, W.; XUE, C. Effects of modified starches on the gel properties of Alaska Pollock surimi subjected to different temperature treatments. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 20-28, 2016.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited Review:  $\beta$ -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 785-796, 2004.

KONTULA, P.; SUIHKO, M. L.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. The Effect of Lactose Derivatives on Intestinal Lactic Acid Bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 249-256, 1999.

KORNHAUSER, A.; COELHO, S. G.; HEARING, V. J. Applications of hydroxy acids: classification, mechanisms, and photoactivity. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology : CCID**, v. 3, p. 135-142, 2010.

KOUTINA, G.; KNUDSEN, J. C.; ANDERSEN, U.; SKIBSTED, L. H. Influence of colloidal calcium phosphate level on the microstructure and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 654-659, 2015.

KRUIF, C. G. D.; ANEMA, S. G.; ZHU, C.; HAVEA, P.; COKER, C. Water holding capacity and swelling of casein hydrogels. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 372-379, 2015.

KURIHARA, Y.; SHIMADA, T.; SAITOH, M.; IKEDA, K.; SUGIYAMA, H.; KOHNO, H. **Taste-modification composition and method for stabilizing taste-modifier**. US 5405641 A, 22 nov. 1993, 11 abr. 1995.

LAKEMON, C. M. M.; VAN VLIET, T. Rheological properties of acid skim milk gels as affected by the spatial distribution of the structural elements and the interaction forces between them. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 585-593, 2008.

LAUVERJAT, C.; DÉLÉRIS, I.; TRÉLÉA, I. C.; SALLES, C.; SOUCHON, I. Salt and Aroma Compound Release in Model Cheeses in Relation to Their Mobility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 9878-9887, 2009.

LAWRENCE, G.; BUCHIN, S.; ACHILLEOS, C.; BÉRODIER, F.; SEPTIER, C.; COURCOUX, P.; SALLES, C. In Vivo Sodium Release and Saltiness Perception in Solid Lipoprotein Matrices. 1. Effect of Composition and Texture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 21, p. 5287-5298, 2012a.

LAWRENCE, G.; SALLES, C.; PALICKI, O.; SEPTIER, C.; BUSCH, J.; THOMAS-DANGUIN, T. Using cross-modal interactions to counterbalance salt reduction in solid foods. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 2, p. 103-110, 2011.

LAWRENCE, G.; SALLES, C.; SEPTIER, C.; BUSCH, J.; THOMAS-DANGUIN, T. Odour–taste interactions: A way to enhance saltiness in low-salt content solutions. **Food Quality and Preference**, v. 20, n. 3, p. 241-248, 2009.

LAWRENCE, G.; SEPTIER, C.; ACHILLEOS, C.; COURCOUX, P.; SALLES, C. *In Vivo* Sodium Release and Saltiness Perception in Solid Lipoprotein Matrices. 2. Impact of Oral Parameters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 21, p. 5299-5306, 2012b.

LE DEAN, A.; MARIETTE, F.; LUCAS, T.; MARIN, M. Assessment of the State of Water in Reconstituted Milk Protein Dispersions by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). **LWT - Food Science and Technology**, v. 34, n. 5, p. 299-305, 2001.

LEONE, R. D. S.; COLMAN, T. A. D.; SCHNITZLER, E.; ELLENDERSEN, L. N.; MASSON, M. L. Evolved gas analysis (coupled TG–DSC–FTIR) applied to the thermal behaviour of inulin. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 108, p. 323-326, 2014.

LI, W.; WANG, K.; SUN, Y.; YE, H.; HU, B.; ZENG, X. Lactosucrose and its analogues derived from lactose and sucrose: Influence of structure on human intestinal microbiota in vitro. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 73-82, 2015.

LOURENÇO NETO, J. P. M. **Queijos: Aspectos Tecnológicos**. Juiz de Fora, Minas Gerais: Instituto Cândido Tostes, 2013.

LUBBERS, S. Texture-Aroma Interactions. In: VOILLEY, A.; ETIÉVANT, P. (Ed.) **Flavour in Food**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 327.

LUCEY, J. A. ADSA Foundation Scholar Award. Formation and physical properties of milk protein gels. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 281-294, 2002.

LUCEY, J. A. Rennet-Induced Coagulation of Milk. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**: Elsevier Science, 2011. p.579-584.

LUCEY, J. A.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Whey separation in acid skim milk gels made with glucono- $\delta$ -lactone: effects of heat treatment and gelation temperature. **Journal of Texture Studies**, v. 29, n. 4, p. 413-426, 1998.

LUCEY, J. A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. **Food Research International**, v. 30, n. 7, p. 529-542, 1998.

LUCEY, J. A.; TAMEHANA, M.; SINGH, H.; MUNRO, P. A. A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- $\delta$ -lactone. **Food Research International**, v. 31, n. 2, p. 147-155, 1998.

LUCEY, J. A.; TAMEHANA, M.; SINGH, H.; MUNRO, P. A. Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono- $\delta$ -lactone. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 3, p. 415-427, 2000.

LUCEY, J. A.; VAN VLIET, T.; GROLLE, K.; GEURTS, T.; WALSTRA, P. Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- $\delta$ -lactone. 1. Rheological properties. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 6–7, p. 381-388, 1997.

LV, Y.; TAO, L.; ANNIE BLIGH, S. W.; YANG, H.; PAN, Q.; ZHU, L. Targeted delivery and controlled release of doxorubicin into cancer cells using a multifunctional graphene oxide. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 652-660, 2016.

LYNGLEV, G. B.; KOKA, R.; MEHNERT, D. W.; FRITSCH, R. J. **Method for producing a fermented dairy product**. US 7186427 B2, 29 mar. 2005, 6 mar. 2007.

MARTÍN-DIANA, A. B.; JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 10, p. 827-833, 2003.

MARTIN, F.; CAYOT, N.; MARIN, A.; JOURNAUX, L.; CAYOT, P.; GERVAIS, P.; CACHON, R. Effect of oxidoreduction potential and of gas bubbling on rheological properties and microstructure of acid skim milk gels acidified with glucono- $\delta$ -lactone. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 12, p. 5898-5906, 2009.

MATUDA, T. G.; CHEVALLIER, S.; DE ALCÂNTARA PESSÔA FILHO, P.; LEBAIL, A.; TADINI, C. C. Impact of guar and xanthan gums on proofing and calorimetric parameters of frozen bread dough. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 3, p. 741-746, 2008.

MATUDA, T. G.; PARRA, D. F.; LUGÃO, A. B.; TADINI, C. C. Influence of vegetable shortening and emulsifiers on the unfrozen water content and textural properties of frozen French bread dough. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 275-280, 2005.

MCCUTCHEON, N. B. Human psychophysical studies of saltiness suppression by amiloride. **Physiology & Behavior**, v. 51, n. 5, p. 1069-1074, 1992.

MCINTYRE, I.; O' SULLIVAN, M.; O' RIORDAN, D. Effects of calcium chelators on calcium distribution and protein solubility in rennet casein dispersions. **Food Chemistry**, v. 197, Part A, p. 233-239, 2016.

MCSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. **Advanced Dairy Chemistry**. New York: Springer-Verlag, 2016. p. 498.

MELETHARAYIL, G. H.; PATEL, H. A.; HUPPERTZ, T. Rheological properties and microstructure of high protein acid gels prepared from reconstituted milk protein concentrate powders of different protein contents. **International Dairy Journal**, v. 47, n. 0, p. 64-71, 2015.

MELLEMA, M.; WALSTRA, P.; VAN OPHEUSDEN, J. H. J.; VAN VLIET, T. Effects of structural rearrangements on the rheology of rennet-induced casein particle gels. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 98, n. 1, p. 25-50, 2002.

MENABUE, L.; SALADINI, M.; UGOLETTI, N. Metal(II) binding by natural ionic glycosides: A solution study on 2,2'-bipyridine containing ternary systems of Cu(II) and Ni(II) with lactobionic acid. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 69, n. 4, p. 217-222, 1998.

MERABTINE, Y.; LUBBERS, S.; ANDRIOT, I.; TROMELIN, A.; GUICHARD, E. Retention/release equilibrium of aroma compounds in fat-free dairy gels. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 9, p. 1403-1409, 2010.

MEYNIER, A.; RAMPON, V.; DALGALARRONDO, M.; GENOT, C. Hexanal and t-2-hexenal form covalent bonds with whey proteins and sodium caseinate in aqueous solution. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 8, p. 681-690, 2004.

MIKKELSEN, P. **World Cheese Market 2000-2020**. PM FOOD & DAIRY CONSULTING. Denmark, p.35. 2014.

MOREAU, C.; GUICHARD, E. Flavor-Food Compound Interactions by NMR Spectroscopy. In: WEBB, G. (Ed.). **Modern Magnetic Resonance**: Netherlands: Springer, 2006, p.1611-1615.

MORIN-SARDIN, S.; RIGALMA, K.; COROLLER, L.; JANY, J.-L.; COTON, E. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. **Food Microbiology**, v. 56, p. 69-79, 2016.

MOSCA, A. C.; ANDRIOT, I.; GUICHARD, E.; SALLES, C. Interactions between Na<sup>+</sup> ions and protein matrices: binding, mobility and in vitro release of Na<sup>+</sup> ions 9th **International Taste Nutrition Health Congress**, 2014, Dijon, France.

MOSCA, A. C.; ANDRIOT, I.; GUICHARD, E.; SALLES, C. Binding of Na<sup>+</sup> ions to proteins: Effect on taste perception. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 33-40, 2015a.

MOSCA, A. C.; VAN DE VELDE, F.; BULT, J. H. F.; VAN BOEKEL, M. A. J. S.; STIEGER, M. Taste enhancement in food gels: Effect of fracture properties on oral breakdown, bolus formation and sweetness intensity. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 794-802, 2015b.

MOUADDAB, M.; FOUCAT, L.; DONNAT, J. P.; RENOU, J. P.; BONNY, J. M. Absolute quantification of Na<sup>+</sup> bound fraction by double-quantum filtered <sup>23</sup>Na NMR spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 189, n. 1, p. 151-155, 2007.

MUKHERJEE, R.; YUN, J. W. Lactobionic acid reduces body weight gain in diet-induced obese rats by targeted inhibition of galectin-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 463, n. 4, p. 1311-1316, 2015.

MURRAY, E. D.; ARNTFIELD, S. D.; ISMOND, M. A. H. The Influence of Processing Parameters on Food Protein Functionality II. Factors Affecting Thermal Properties as Analyzed by Differential Scanning Calorimetry. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 18, n. 2, p. 158-162, 1985.

NIELSEN, P. M. **Meat based food product comprising lactobionic acid**. WO 2005079604 A1, 23 fev. 2004, 1 set. 2005.

NIELSEN, P. M. **Non-dairy beverage product comprising calcium lactobionate**. WO 2006036791 A1, 24 fev. 2004, 6 abr. 2006.

NIELSEN, P. M.; HOEIER, E. **Food products containing aldobionic acid**. WO 2009007398 A1, 9 jul. 2007, 15 jan. 2009.

NORONHA, N.; DUGGAN, E.; ZIEGLER, G. R.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Inclusion of starch in imitation cheese: Its influence on water mobility and cheese functionality. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 8, p. 1612-1621, 2008.

NUNES, C. A.; ALVARENGA, V. O.; DE SOUZA SANT'ANA, A.; SANTOS, J. S.; GRANATO, D. The use of statistical software in food science and technology: Advantages, limitations and misuses. **Food Research International**, v. 75, p. 270-280, 2015.

ORREGO, M.; TRONCOSO, E.; ZÚÑIGA, R. N. Aerated whey protein gels as new food matrices: Effect of thermal treatment over microstructure and textural properties. **Journal of Food Engineering**, v. 163, p. 37-44, 2015.

ORTEGA-REQUENA, S.; REBOUILLAT, S. Bigger data open innovation: potential applications of value-added products from milk and sustainable valorization of by-products from the dairy industry. **Green Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 5100-5113, 2015.

PANG, Z.; DEETH, H.; SHARMA, R.; BANSAL, N. Effect of addition of gelatin on the rheological and microstructural properties of acid milk protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 43, n. 0, p. 340-351, 2015.

PANG, Z.; DEETH, H.; SOPADE, P.; SHARMA, R.; BANSAL, N. Rheology, texture and microstructure of gelatin gels with and without milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 35, n. 0, p. 484-493, 2014.

PANOUILLE, M.; SAINT-EVE, A.; DE LOUBENS, C.; DÉLÉRIS, I.; SOUCHON, I. Understanding of the influence of composition, structure and texture on salty perception in model dairy products. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 4, p. 716-723, 2011.

PATERSON, A. H. J. Lactose: Production, Applications. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2: London: Elsevier Science, 2011.



PATERSON, A. H. J.. Lactose and Oligosaccharides: Lactose: Production, Applications. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Reference Module in Food Science**: London: Elsevier, 2016.

PEDRUZZI, I.; BORGES DA SILVA, E. A.; RODRIGUES, A. E. Production of lactobionic acid and sorbitol from lactose/fructose substrate using GFOR/GL enzymes from *Zymomonas mobilis* cells: A kinetic study. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 2, p. 183-191, 2011.

PEDRUZZI, I.; DA SILVA, E. A. B.; RODRIGUES, A. E. Selection of resins, equilibrium and sorption kinetics of lactobionic acid, fructose, lactose and sorbitol. **Separation and Purification Technology**, v. 63, n. 3, p. 600-611, 2008.

PENG, Y.; HORNE, D. S.; LUCEY, J. A. Impact of preacidification of milk and fermentation time on the properties of yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 7, p. 2977-2990, 2009.

PERREAULT, V.; BRITTEN, M.; TURGEON, S. L.; SEUVRE, A. M.; CAYOT, P.; VOILLEY, A. Effects of heat treatment and acid-induced gelation on aroma release from flavoured skim milk. **Food Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 90-95, 2010.

PFLAUM, T.; KONITZER, K.; HOFMANN, T.; KOEHLER, P. Analytical and Sensory Studies on the Release of Sodium from Wheat Bread Crumb. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 26, p. 6485-6494, 2013.

PHAN, V. A.; YVEN, C.; LAWRENCE, G.; CHABANET, C.; REPARET, J. M.; SALLES, C. In vivo sodium release related to salty perception during eating model cheeses of different textures. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 9, p. 956-963, 2008.

PLAYNE, M. J.; CRITTENDEN, R. G. Galactooligosaccharides and Other Products Derived from Lactose. In: MCSWEENEY, P. L. H. e FOX, P. F. (Ed.). **Advanced Dairy Chemistry: Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. New York: Springer, 2009. p.221-202.

PONS, M.; FISZMAN, S. M. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. **Journal of Texture Studies**, v. 27, n. 6, p. 597-624, 1996.

QI, B.; ZHANG, Q.; SUI, X.; WANG, Z.; LI, Y.; JIANG, L. Differential scanning calorimetry study—Assessing the influence of composition of vegetable oils on oxidation. **Food Chemistry**, v. 194, p. 601-607, 2016.

QUITMANN, H.; FAN, R.; CZERMAK, P. Acidic Organic Compounds in Beverage, Food and Feed Production. In: ZORN, H. e CZERMAK, P. (Ed.). **Biotechnology of Food and Feed Additives**: Berlin: Springer, 2014. p.91-142.

RAAKE, W.; KLAUSER, R. J.; ELLING, H.; MEINETSBERGER, E. Anticoagulant and antithrombotic properties of synthetic sulfated bis-lactobionic acid amides. **Thrombosis Research**, v. 56, n. 6, p. 719-730, 1989.

RANKIN, S.; BODYFELT, F. Headspace diacetyl as affected by stabilizers and emulsifiers in a model dairy system. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 921, 1996.

REID, D. S.; FENNEMA, O. R. Água e Gelo. In: FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. (Ed.). **Química de Alimentos de Fennema**: Porto alegre: Artmed Editora, 2009.

RENTSCHLER, E.; SCHUH, K.; KREWINKEL, M.; BAUR, C.; CLAAßEN, W.; MEYER, S.; KUSCHEL, B.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Enzymatic production of lactulose and epilactose in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 6767-6775, 2015.

RITZOULIS, C.; KARAYANNAKIDIS, P. D. Proteins as texture modifiers. In: CHEN, J. e ROSENTHAL, A. (Ed.). **Modifying Food Texture: Novel Ingredients and Processing Techniques**: London: Elsevier Science, 2015.

ROLDÁN, V.; SANTORO, M.; GONZÁLEZ, J. C.; SALAS-PEREGRIN, J. M.; SIGNORELLA, S.; SALA, L. F. Kinetics and mechanism of the reduction of CrVI and CrV by d-lactobionic acid. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 2, p. 347-357, 2004.

ROOS, Y. H. Thermal analysis, state transitions and food quality. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 71, n. 1, p. 197-203, 2003.

RUGGIRELLO, M.; COCOLIN, L.; DOLCI, P. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. **Food Microbiology**, v. 59, p. 112-118, 2016.

RUIZ-CABRERA, M. A.; GOU, P.; FOUCAT, L.; RENOU, J. P.; DAUDIN, J. D. Water transfer analysis in pork meat supported by NMR imaging. **Meat Science**, v. 67, n. 1, p. 169-178, 2004.

SAARELA, M.; HALLAMAA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; MÄTTÖ, J. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic Lactobacillus strains. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 4, p. 291-302, 2003.

SAINT-EVE, A.; LAUVERJAT, C.; MAGNAN, C.; DÉLÉRIS, I.; SOUCHON, I. Reducing salt and fat content: Impact of composition, texture and cognitive interactions on the perception of flavoured model cheeses. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 167-175, 2009.

SAINT-EVE, A.; LÉVY, C.; LE MOIGNE, M.; DUCRUET, V.; SOUCHON, I. Quality changes in yogurt during storage in different packaging materials. **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 285-293, 2008.

SAINT-EVE, A.; MARTIN, N.; LEVY, C.; SOUCHON, I. How can protein ratio affect aroma release, physical properties and perceptions of yoghurt? In: WENDER, L. P. B. e MIKAEL AGERLIN, P. (Ed.). **Developments in Food Science**. London: Elsevier, v. 43, 2006. p.391-394.

SAKAI, T.; HATANO, Y.; MATSUDA-HIROSE, H.; ZHANG, W.; TAKAHASHI, D.; JEONG, S. K.; ELIAS, P. M.; FUJIWARA, S. Combined Benefits of a PAR2 Inhibitor and Stratum Corneum Acidification for Murine Atopic Dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 2, p. 538-541, 2016.

SCHUCK, P. Lactose: Crystallization. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2 ed. London: Elsevier Science, v.4, 2011.

SCHWERTFEGER, M.; BUCHHEIM, W. Acidification of Milk by Glucono- $\delta$ -lactone under High Pressure A2 In: ISAACS, N. S. (Ed.). **High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry**. London: Woodhead Publishing, 1998. p.242-247.

SCOTT, R.; ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A.; BARRADO, A. M. **Fabricación de queso**. Zaragoza: Acribia, 2002.

SEKI, N.; SAITO, H. Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 110-115, 2012.

SIAMAND, R.; DEETH, H. C.; AL-SAAD, J. M. S. Textural and sensory properties of a calcium-induced milk gel. **Journal of Food Engineering**, v. 139, p. 10-12, 2014.

SIEFARTH, C.; TRAN, T. B. T.; MITTERMAIER, P.; PFEIFFER, T.; BUETTNER, A. Effect of Radio Frequency Heating on Yoghurt, II: Microstructure and Texture. **Foods**, v. 3, p. 369-393, 2014.

SILVA, A. N.; PEREZ, R.; MINIM, V. P. R.; MARTINS, D. D. S. A.; MINIM, L. A. Integrated production of whey protein concentrate and lactose derivatives: What is the best combination? **Food Research International**, v. 73, p. 62-74, 2015a.

SILVA, J. V. C.; LEGLAND, D.; CAUTY, C.; KOLOTUEV, I.; FLOURY, J. Characterization of the microstructure of dairy systems using automated image analysis. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 360-371, 2015b.

SILVA, J. V. C.; LORTAL, S.; FLOURY, J. Diffusion behavior of dextrans in dairy systems of different microstructures. **Food Research International**, v. 71, p. 1-8, 2015.

SILVA, N. N.; PIOT, M.; DE CARVALHO, A. F.; VIOLLEAU, F.; FAMEAU, A.-L.; GAUCHERON, F. pH-induced demineralization of casein micelles modifies their physico-chemical and foaming properties. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 2, p. 322-330, 2013.

SILVÉRIO, S. C.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Perspectives on the biotechnological production and potential applications of lactosucrose: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 19, Part A, p. 74-90, 2015.

SOBRAL, D.; BUENO COSTA, R. G.; MACHADO, G. M.; JACINTO DE PAULA, J. C.; MARTINS TEODORO, V. A.; NUNES, N. M.; DOS SANTOS PIRES, A. C.; PINTO, M. S. Can lutein replace annatto in the manufacture of Prato cheese? **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 349-355, 2016.

SOŁOWIEJ, B.; CHEUNG, I. W. Y.; LI-CHAN, E. C. Y. Texture, rheology and meltability of processed cheese analogues prepared using rennet or acid casein with or without added whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 37, n. 2, p. 87-94, 2014.

SWAISGOOD, H. E. Características do leite. In: FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. (Ed.). **Química de Alimentos de Fennema**: Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

SYARIFUDDIN, A.; SEPTIER, C.; SALLES, C.; THOMAS-DANGUIN, T. Reducing salt and fat while maintaining taste: An approach on a model food system. **Food Quality and Preference**, v. 48, Part A, p. 59-69, 2016.

TAHMASEBI, M.; LABBAFI, M.; EMAM-DJOMEH, Z.; YARMAND, M. S. Manufacturing the novel sausages with reduced quantity of meat and fat: The product development, formulation optimization, emulsion stability and textural characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 76-84, 2016.

TARREGA, A.; YVEN, C.; SEMON, E.; SALLES, C. Aroma release and chewing activity during eating different model cheeses. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 849, 2008a.

TARREGA, A.; YVEN, C.; SÉMON, E.; SALLES, C. Aroma release and chewing activity during eating different model cheeses. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 8, p. 849-857, 2008b.

TAVEL, L.; ANDRIOT, I.; MOREAU, C.; GUICHARD, E. Interactions between  $\beta$ -Lactoglobulin and Aroma Compounds: Different Binding Behaviors as a Function of Ligand Structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10208-10217, 2008.

TOURNIER, C.; SULMONT-ROSSÉ, C.; SÉMON, E.; VIGNON, A.; ISSANCHOU, S.; GUICHARD, E. A study on texture–taste–aroma interactions: Physico-chemical and cognitive mechanisms. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 8, p. 450-458, 2009.

TROMELIN, A.; ANDRIOT, I.; GUICHARD, E. Protein-flavour interactions. In: VOILLEY, A. e ETIÉVANT, P. (Ed.). **Flavour in Food**. London: Woodhead Publishing, 2006. p.172-207.

UDABAGE, P.; MCKINNON, I. R.; AUGUSTIN, M.-A. Mineral and casein equilibria in milk: effects of added salts and calcium-chelating agents. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 03, p. 361-370, 2000.

VAN RUTH, S. M.; VILLENEUVE, E. Influence of  $\beta$ -lactoglobulin, pH and presence of other aroma compounds on the air/liquid partition coefficients of 20 aroma compounds varying in functional group and chain length. **Food Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 157-164, 2002.

VAN VLIET, T. **Rheology and Fracture Mechanics of Foods**. Boca Raton: CRC Press, 2013.

VAN VLIET, T.; LAKEMON, C. M. M.; VISSCHERS, R. W. Rheology and structure of milk protein gels. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 298-304, 2004.

VENEMA, K. Intestinal fermentation of lactose and prebiotic lactose derivatives, including human milk oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 123-140, 2012.

VOILLEY, A.; SOUCHON, I. 6 - Flavour retention and release from the food matrix: an overview. In: VOILLEY, A. e ETIÉVANT, P. (Ed.). **Flavour in Food**. London: Woodhead Publishing, 2006. p.117-132.

WALSTRA, P.; VAN VLIET, T. Sistemas dispersos: Considerações básicas. In: FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. (Ed.). **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

WALTER, T.; BEGLI, A. H. **Flavour enhancer**. US 20110244080 A1, 19 dec. 2008, 6 oct. 2011.

WEN, J.; ARTHUR, K.; CHEMMALIL, L.; MUZAMMIL, S.; GABRIELSON, J.; JIANG, Y. Applications of differential scanning calorimetry for thermal stability analysis of proteins: qualification of DSC. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 101, n. 3, p. 955-964, 2012.

WHELTON, P. K. Sodium, potassium, blood pressure, and cardiovascular disease in humans. **Current Hypertension Reports**, v. 16, n. 8, p. 465, 2014.

YOSHIDA, H.; HATAKEYAMA, T.; HATAKEYAMA, H. Characterization of water in polysaccharide hydrogels by DSC. **Journal of Thermal Analysis**, v. 40, n. 2, p. 483-489, 1992.

ZANDSTRA, E. H.; LION, R.; NEWSON, R. S. Salt reduction: Moving from consumer awareness to action. **Food Quality and Preference**, v. 48, Part B, p. 376-381, 2016.

## APÊNDICE I

**ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA FOOD CHEMISTRY**



## Effect of lactobionic acid on the acidification, rheological properties and aroma release of dairy gels



Jéssica C. Bigaski Ribeiro<sup>a,b,\*</sup>, Daniel Granato<sup>c</sup>, Maria Lucia Masson<sup>b</sup>, Isabelle Andriot<sup>a</sup>, Ana Carolina Mosca<sup>a</sup>, Christian Salles<sup>a</sup>, Elisabeth Guichard<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR1324 INRA, CNRS, UB-FC, F-21000 Dijon, France

<sup>b</sup> Department of Chemical Engineering, TC/PPGEAL, Federal University of Paraná, R. Cel. Francisco Héracito dos Santos 210, Polytechnic Center, 81531-980 Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>c</sup> Department of Food Engineering, State University of Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti 4748, Uvaranas Campus, 84030-900 Ponta Grossa, Paraná, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 January 2016

Received in revised form 16 March 2016

Accepted 18 March 2016

Available online 19 March 2016

#### Keywords:

Dairy protein gel

Acidification

Aroma release

Sodium ionic binding

Rheology

### ABSTRACT

The food industry is investigating new technological applications of lactobionic acid (LBA). In the current work, the effect of lactobionic acid on the acidification of dairy gels (pH 5.5 and 6.2), rheological properties using a double compression test, sodium mobility using <sup>23</sup>Na NMR technique and aroma release using headspace GC–FID were studied. Our results showed that it is possible to use LBA as an alternative to glucono-δ-lactone (GDL) for the production of dairy gels with a controlled pH value. Small differences in the rheological properties and in the amount of aroma volatile organic compounds that were released in the vapour phase, but no significant difference in the sodium ion mobility were obtained. The gels produced with LBA were less firm and released less volatile aroma compounds than the gels produced with GDL. The gels at pH 6.2 were firmer than those at pH 5.5 and had a more organised structure around the sodium ions.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The principal by-product of cheese production is whey, which has different applications in the food industry and in animal nutrition but has low added value. However, current advances in biotechnological research make it possible to convert the lactose extracted from cheese whey into products with high value and with several technological applications (Gutiérrez, Hamoudi, & Belkacemi, 2012). Among these lactose derivatives, lactobionic acid (LBA), an aldonic acid named 4-O-β-D-galactopyranosyl-D-gluconic acid, can be obtained through the oxidation of lactose. LBA has been largely investigated in the chemical and pharmaceutical sectors. As a pharmaceutical application, it is seen as a promising drug excipient, while the chemical industries are looking for new ways to enhance bio-production and more efficient ways to purify this compound (Alonso, Rendueles, & Díaz, 2013). At present, the applications of LBA within the food sector are very scarce; however, this product could have a promising future in the food industry. The potential of using LBA in the food industry has already been

reported in several studies, such as the increase of yield in cheese production (Bradbury et al., 2002; Nielsen & Hoeier, 2009); the enhancement of food flavour (Walter & Begli, 2011) and its prebiotic capacity (Adebola, Corcoran, & Morgan, 2014; Saarela, Hallamaa, Mattila-Sandholm, & Mäntö, 2003). In particular, LBA could be introduced in the cheese production process as a substitute for glucono-δ-lactone (GDL), which is extensively used as an acidifying agent in the dairy industry. Nevertheless, GDL does not present the same functional attributes as LBA. When replacing GDL with LBA, it seems that higher costs can be justified by the potential functionality of LBA.

Furthermore, because of the growing concern about cardiovascular diseases caused by excessive consumption of sodium (Whelton, 2014), strategies to reduce the sodium addition to processed foods are still a challenge for global food industries (Zandstra, Lion, & Newson, 2016). Considering the possible applications of LBA, it could be a new ally to reduce sodium in foods because many recent technologies have used texture modification and enhancement techniques of salt and aroma release in order to modify the sensory perception of the product. Changes in viscosity or hardness significantly impacts on flavour perception by changing the aroma and/or taste release. For example, it has been shown that the weakest carrageenan and gellan gels were found to be perceived as saltier and sweeter than the hardest ones (Costell,

\* Corresponding author at: Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

E-mail addresses: [jessicabigaski@hotmail.com](mailto:jessicabigaski@hotmail.com) (J.C.B. Ribeiro), [granatod@gmail.com](mailto:granatod@gmail.com) (D. Granato), [masson@ufpr.br](mailto:masson@ufpr.br) (M.L. Masson), [Isabelle.Andriot@dijon.inra.fr](mailto:Isabelle.Andriot@dijon.inra.fr) (I. Andriot), [acmosca@outlook.com](mailto:acmosca@outlook.com) (A.C. Mosca), [salles@dijon.inra.fr](mailto:salles@dijon.inra.fr) (C. Salles), [Elisabeth.Guichard@dijon.inra.fr](mailto:Elisabeth.Guichard@dijon.inra.fr) (E. Guichard).

## APÊNDICE II

TRABALHO APRESENTADO NO 9TH INTERNATIONAL TASTE NUTRITION  
HEALTH CONGRESS, 2014, DIJON, FRANÇA.





## Lactobionic acid: a possible substituent of glucono-delta-lactone in dairy products

Jessica BIGASKI RIBEIRO<sup>a,b,c,\*</sup>, Maria Lucia MASSON<sup>b</sup>, Ana-Carolina MOSCA<sup>c</sup>, Christian SALLES<sup>c</sup> and Elisabeth GUICHARD<sup>c</sup>.

<sup>a</sup> CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasilia – DF 70040-220, Brazil; <sup>b</sup> Corresponding author: jessica-caroline.bigaski-ribeiro@di.ijon.inra.fr

<sup>c</sup> TCI/PPGEAL, Federal University of Paraná, Brazil.

<sup>d</sup> Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR1324 INRA, CNRS, UBF-21000 Dijon, France.

Cheese manufacturing leads to a great amount of by-products among which lactose can be easily converted into derivatives like lactobionic acid (LBA), that has been highlighted due to its various applications in the chemical, pharmaceutical and food sectors. For food industry one of the most interesting features of LBA seems to be its capacity of enhancing or masking flavour. However, to our knowledge, this assumption has not been validated by scientific studies.

### Material and Methods

We developed dairy matrices (Table 1) with salty, sweet or bitter taste acidified to pH 6.2 or 5.5 using LBA instead of glucono-delta-lactone (GDL), acidifying agent widely used in the food industry.

Table 1. Composition of dairy matrices

Ingredient (%)	Salty		Sweet		Bitter	
	pH 6.2	pH 5.5	pH 6.2	pH 5.5	pH 6.2	pH 5.5
Milk Protein*	20	20	20	20	20	20
Salt	1	1	-	-	-	-
Sugar	-	-	2.5	2.5	-	-
Leucine	-	-	-	-	0.8	0.8
LBA	0.5	2.7	0.9	2.9	0.9	2.9
GDL	0.25	1.4	0.5	1.5	0.5	1.5

\*74.5% protein.

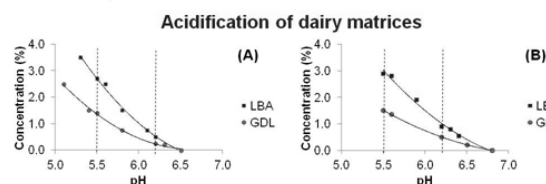


Figure 1. Acidification curves of salty (A), sweet (B) and bitter (B) milk matrices

The acidification behavior of the matrices was influenced by the taste agent added. Salt matrices required less acid amount than sweet and bitter matrices to achieve the desired pH (Figure 1). This indicates that the salt influences the proteins charges of the matrix.

### Results and Discussion

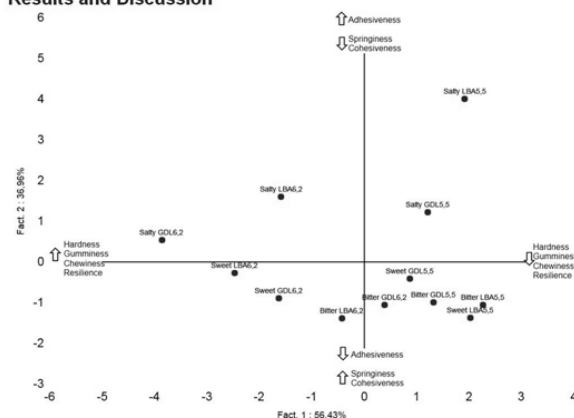


Figure 4. A scatter plot (PC1 vs. PC2) on the main sources of texture variability between the dairy matrices samples after Principal Component Analysis.

The different matrices were discriminated along axis 1 by their hardness, the less acidic matrices (pH 6.2) were more firm and resistant than those at pH 5.5 (Figure 4). Parameters such as elasticity, cohesiveness, resilience and chewiness did not show significant differences between the samples analyzed.

**Conclusion:** The results of this study indicate that it could be possible to use LBA in replacement to GDL. However this can influence the perception of by means of changes in the characteristics of texture or even interactions with agents of taste, which will be tested in a following work.

### TPA Analysis

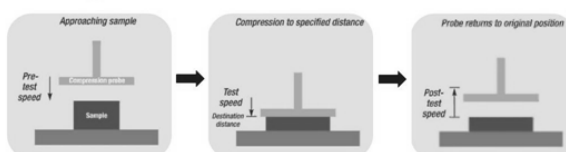


Figure 2. Representation of a TPA compression cycle in TA.XT plus.

Changes in the texture profile of the matrices were tested instrumentally using texturometer TA.XT2 plus through TPA test (Figure 2) with dual compression of samples to simulate parameters obtained in sensory analysis.

Table 2. Parameters utilized to TPA test of dairy matrices

Compression	Speed pre and post-test	Speed test
30%	1 mm.s <sup>-1</sup>	0.8 mm.s <sup>-1</sup>

The double compression test generates the graph shown in Figure 3, with the extracted parameters.

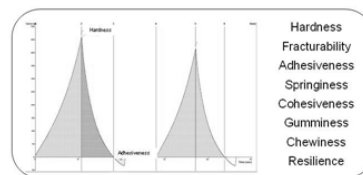


Figure 3. Graphic obtained by a double compression cycle in TPA.

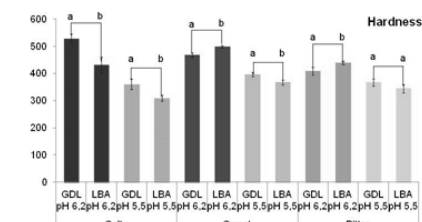


Figure 5. Comparison of hardness of dairy matrices. Different letters represent a significant difference between pairs ( $p < 0.05$ )

Besides the pH effect on matrices hardness, an additional effect of the nature of acidifying agent used was observed for all matrices, except for the bitter matrix at the lower pH (Figure 5).

The dairy matrix texture was influenced by pH, acid type and the taste agent used for its production. The properties of bitter matrix were less affected by changes in formulation, indicating that leucine did not impact the protein network. For the sweet matrix, although close to the bitter matrix behavior, there was differentiation between samples with the same pH using GDL or LBA in texture characteristics such as hardness.

The larger effects were observed for salty matrices for the majority of parameters. This could be explained by a combined effect of acidifying agent and salt on the protein network.

**APÊNDICE III****ARTIGO SUBMETIDO**

## **Some instrumental methods applied in food chemistry to characterize lactulose and lactobionic acid**

### **Abstract**

Lactose can be obtained as a by-product from whey and it is a source of several derivatives including lactulose and lactobionic acid. In this study these two compounds were analysed by using the following techniques: thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG); differential scanning calorimetry coupled with optical microscope (DSC-thermomicrometry); infrared spectroscopy (FTIR); and X-ray diffractometry (XRD). The use of the DSC technique coupled with microscopy made it possible to observe that the lactobionic acid showed several thermal events due to its decomposition, which occurred at temperatures higher than 50 °C. The lactulose began to decompose above 180 °C. The DSC curves were used to calculate the purity of the lactulose (according to the Van't Hoff equation), which was 98% and the melting point peak, which was at 171 °C. The lactulose showed crystalline behaviour that was different to that of the lactobionic acid, which was attributed to the high hygroscopicity of the former. The purity of the lactobionic acid was not calculated because the decomposition occurred in consecutive stages.

### **Keywords**

Lactulose, lactobionic acid, thermal analysis, kinetic studies, X-ray, FTIR.